



Departamento de Bioquímica

**Estudio de subpoblaciones celulares en la fracción vasculo-
estromal del tejido adiposo humano con características de
célula madre y con diverso potencial de diferenciación**

TESIS DOCTORAL

Alejandro Blázquez Martínez

Madrid, 2015



Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de subpoblaciones celulares en la fracción vasculo-
estromal del tejido adiposo humano con características de
célula madre y con diverso potencial de diferenciación**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por Alejandro Blázquez Martínez,
Licenciado en Ciencias Biológicas por la
Universidad de Alcalá de Henares,
para optar al grado de Doctor

Trabajo dirigido por la Dra. María Paz de Miguel González

Grupo de Ingeniería Celular, Instituto de Investigaciones Sanitarias del
Hospital Universitario La Paz, IdiPaz
Madrid, 2015



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS PARA SU
PRESENTACIÓN**

MARIA PAZ DE MIGUEL GONZÁLEZ, Doctora en Ciencias Biológicas y Directora del Grupo de Ingeniería Celular del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario La Paz de Madrid

CERTIFICA QUE:

ALEJANDRO BLÁZQUEZ MARTÍNEZ, con DNI 07243815 B, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: **“Estudio de subpoblaciones celulares en la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo humano con características de célula madre y con diverso potencial de diferenciación”** y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como tesis doctoral.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado. En Madrid, 10 de Junio de 2015.

Fdo.: Dra. María Paz de Miguel González

A mis padres

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la finalización de este trabajo y en particular a las siguientes personas:

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. María de Miguel, amiga y mentora, su paciencia, apoyo y dedicación en la dirección de esta tesis. En todos estos años he aprendido mucho de ella. Espero que, en el futuro, podamos seguir colaborando en todos esos proyectos, excitantes e imaginativos, que nos gustan tanto.

También me gustaría agradecer la compañía (y a veces la paciencia) que han demostrado mis compañeros de, y en el laboratorio: Curro, Pili, Yago, Shere, Nacho, Massimo, Diego y Fátima. Os quiero a todos.

A los doctores Manuel Nistal, Francisco Arnalich, Jorge Fernández-Delgado, Massimo Chiesa y Mar Royuela por su apoyo personal, aportación a este trabajo, y apreciada colaboración con nuestro laboratorio. Especial mención me gustaría hacer al Dr. Javier Regadera, quién, en las ocasiones que así lo requerían (él sabe), estuvo ahí desinteresadamente. No lo olvidaré.

Al personal de la Unidad de Investigación del Hospital universitario La Paz y a los trabajadores del Departamento de Genética y Bioestadística, y especialmente a Mariana Diaz-Almirón por tratar estadísticamente mis datos con dedicación y profesionalidad. También me gustaría mencionar a Fernando Núñez del IIB “Alberto Sols”, por su ayuda inestimable en la perfusión de los ratones.

A mis amigos y familiares más cercanos, ellos y ellas saben quién son, porque siempre me apoyaron a pesar de que en ocasiones no me entendieron.

Finalmente, quería agradecer los fondos recibidos para la consecución de este trabajo gracias a las siguientes instituciones:

Ministerio de Sanidad

Ministerio de Economía y Competitividad

Fundación para la Investigación Biomédica del HULP

Fundación Mutua Madrileña

Fundación Marató TV3

Resumen

La fracción vascular estromal del tejido adiposo proporciona células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) fáciles de obtener y en grandes cantidades. Nuestro equipo y otros han logrado significativos efectos terapéuticos pero subóptimos con ADSCs en diversos ámbitos, principalmente debido a las bajas tasas de diferenciación en tipos celulares específicos y con la desventaja de tener efectos secundarios no deseados como consecuencia de las ADSC que permanecen indiferenciadas. Estos datos nos llevaron a buscar nuevos marcadores específicos de células madre para las ADSCs y/o subpoblaciones con mayor potencial de diferenciación a linajes específicos. Encontramos una subpoblación de ADSCs humanas, marcadas por la expresión de c-kit, residentes en zonas perivasculares, y que muestran mayor actividad proliferativa y capacidad de auto-renovación, mayor expresión y actividad de la telomerasa, mayor eficiencia de diferenciación adipogénica *in vitro*, mayor capacidad para el mantenimiento de progenitores cardíacos, y mayor eficiencia pancreatogénica y hepatogénica, independientemente de la expresión de CD105. Nuestros datos sugieren que el aislamiento de subpoblaciones ADSC con anticuerpos anti-c-kit permite la selección de una subpoblación más homogénea y con mayores propiedades cardioprotectoras y aumento del potencial de diferenciación adipogénico y endodérmico, proporcionando una herramienta útil para terapias específicas en aplicaciones de Medicina regenerativa.

Summary

The stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue is an easy to obtain source of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). We and others have achieved significant but suboptimal therapeutic effects with ADSCs in various settings, mainly due to low rates of differentiation into specific cell types and with the downside of undesired side effects as a consequence of the undifferentiated ADSCs. These data prompted us to find new stem cell-specific markers for ADSCs and/or subpopulations with higher differentiation potential towards specific lineages. We found a subpopulation of human ADSCs, identified by c-kit positiveness, which resides in a perivascular location, and shows higher proliferative activity and self-renewal capacity, higher telomerase expression and, activity higher *in vitro* adipogenic efficiency, a higher capacity for the maintenance of cardiac progenitors, and higher pancreatogenic and hepatogenic differentiation efficiency independently of CD105 expression. Our data suggests that the isolation of ADSC subpopulations with anti-c-kit antibodies allows for the selection of a more homogeneous subpopulation with increased cardioprotective properties and increased adipogenic and endodermal differentiation potential, providing a useful tool for specific therapies in Regenerative Medicine applications.

Si te dan un papel pautado, escribe por detrás

Juan Ramón Jiménez (1881-1958)

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	V
SUMMARY.....	IX
ÍNDICE.....	XV
ABREVIATURAS.....	XXI
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las células madre.....	3
2. Células madre mesenquimales.....	4
2.1. Origen de las células madre mesenquimales.....	6
3. Células madre derivadas del tejido adiposo.....	8
3.1. Tipos celulares en la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo.....	9
3.2. Caracterización de las ADSCs.....	11
3.3. Aplicaciones terapéuticas de las ADSCs.....	14
3.3.1. Regeneración directa con ADSCs.....	14
3.3.2. ADSCs como biorreactores.....	15
3.3.3. ADSCs como reclutadores de progenitores celulares.....	16
3.3.4. ADSCs como inmunomoduladores.....	17
4. Hipótesis de trabajo.....	18
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
1. Extracción de células vasculo-estromales de tejido adiposo humano.....	27
2. Extracción de células vasculo-estromales de tejido adiposo de ratón.....	28
3. Obtención de clones celulares.....	29
4. Extracción de cardiomiocitos fetales de ratón.....	29
5. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratón.....	30
6. Perfusión.....	30
7. Inmunohistoquímica.....	31

8. Inmunocitoquímica.....	32
9. Análisis y separación celular por citometría de flujo.....	33
10. Inmuno-separación magnética.....	34
11. Cultivos a largo plazo.....	35
12. Índice de proliferación.....	35
13. Cariotipado.....	36
14. Actividad de la telomerasa.....	37
15. RT-PCR y qPCR.....	37
16. Inducción de diferenciación condrogénica <i>in vitro</i>	38
17. Inducción de diferenciación osteogénica <i>in vitro</i>	39
18. Inducción de diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	40
19. Inducción de diferenciación miogénica <i>in vitro</i>	41
20. Inducción de diferenciación cardiomiogénica <i>in vitro</i> por cocultivo en contacto.....	41
21. Estimulación de progenitores cardiomiocíticos de ratón <i>in vitro</i>	42
22. Inducción de diferenciación cardiomiogénica <i>in vitro</i> por cocultivo sin contacto.....	42
23. Diferenciación cardiomiogénica <i>in vitro</i> por inducción con 5-azacitidina...	42
24. Inducción de fenotipo neuroectodérmico <i>in vitro</i>	43
25. Inducción de fenotipo pancreático <i>in vitro</i>	43
26. Inducción de fenotipo hepático <i>in vitro</i>	44
27. Cuantificación de las diferenciaciones.....	45
28. Imágenes y vídeos.....	45
RESULTADOS	47
1. El tejido adiposo humano contiene una proporción constante de células c-kit+.....	49
2. Parte de la población c-kit expresa también CD105.....	50
3. Las células c-kit tienen capacidad clonogénica.....	50
4. Las células c-kit tienen mayor índice de proliferación y capacidad de autorrenovación.....	51

5. Las células c-kit son cariotípicamente estables y no sufren transformaciones espontáneas en cultivos a largo plazo.....	52
6. Las células c-kit muestran mayor expresión y actividad de telomerasa.....	53
7. Las células c-kit en el tejido adiposo se localizan en el espacio estromal perivascular.....	55
8. Las células c-kit residen en el tejido adiposo.....	56
9. Las ADSCs c-kit+ tienen potencial de diferenciación osteogénico y miogénico similar al de las ADSCs c-kit-.....	56
10. Las ADSCs c-kit+ tienen potencial de diferenciación adipogénico mayor que las ADSCs c-kit-, pero no son preadipocitos.....	58
11. Las ADSCs c-kit+ ayudan a mantener el fenotipo cardíaco en cultivos primarios de cardiomiocitos embrionarios.....	60
12. Las ADSCs c-kit+ tienen potencial de diferenciación neuroectodérmico similar al de las ADSCs c-kit-.....	64
13. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación pancreático que las ADSCs c-kit-.....	65
14. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación hepático que las ADSCs c-kit-.....	66
DISCUSIÓN.....	69
1. La subpoblación ADSC c-kit+ muestra características propias de célula madre.....	71
2. Parte de la subpoblación c-kit+ expresa también CD105.....	72
3. Las ADSCs c-kit+ muestran mayor actividad y expresión de telomerasa....	73
4. Las ADSCs c-kit+ se localizan en el espacio estromal perivascular.....	74
5. Las ADSCs c-kit+ tienen el potencial de diferenciación adipogénico mayor, pero no son preadipocitos.....	75
6. Las ADSCs c-kit+ ayudan a mantener el fenotipo cardíaco en cultivos primarios de cardiomiocitos embrionarios.....	76
7. Las ADSCs c-kit+ tienen el potencial de diferenciación neuroectodérmico similar al de las c-kit-.....	77
8. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación pancreático...	77

9. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación hepático.....	78
10. Propuesta de un modelo de convivencia, diferenciación progresiva y regulación paracrina entre las subpoblaciones de ADSCs.....	79
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXOS	115
1. Blazquez-Martínez et al., 2014	
2. CD Vídeo colonias contráctiles	

Abreviaturas

5-AZA: 5-Azacitidina

ADSC: *Adipose derived stem cell*

AGM: Aorta-gónada-mesonefros

AP: *Alkaline phosphatase*

ASC: *Adipose stromal/stem cell o adult stem cell*

ATTC: *American Type Culture Collection*

BM-MSC: *Bone marrow derived mesenchymal stem cell*

BMP: *Bone morphogenetic protein*

BMPC: *Blood-acquired mesenchymal progenitor cell*

BrdU: Bromodesoxiuridina

BSA: *Bovine serum albumin*

DAPI: *4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's médium*

DMEM-LG: *Dulbecco's modified Eagle's médium-low glucose*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGF: *Epidermal growth factor*

ESC: *Embryonic stem cell*

FACS: *Fluorescence activated cell sorting*

FBS: *Fetal bovine serum*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

HGF: *Hepatocyte growth factor*

HS: *Horse serum*

HSC: *Hematopoietic stem cell*

IBMX: Isobutilmetilxanteno

IFATS: *International federation for adipose therapeutics and science*

ISCT: *International society for cellular therapy*

ITS: Insulina-transferrina-selenio

M y M: Material y métodos

MDA-7: *Melanoma differentiation associated gene-7*

MSC: *Mesenchymal stem cell*

NSC: *Neural stem cell*

OSM: Oncostatina M

P/S: Solución de penicilina y estreptomicina

PBS: *Phosphate buffered saline*

PEDF: *Pigment epithelial-derived factor*

PFA: Paraformaldehido

PGC: *Primordial germ cell*

PGF: *Placental growth factor*

PLA: *Processed lipoaspirate*. Generalmente se utilizará para referirse a células cultivadas a no ser que se indique otra cosa.

SCF: *Stem cell factor*

SVF: *Stromal vascular fraction*. Generalmente se utilizará para referirse a células sin cultivar a no ser que se indique otra cosa.

TBS: *Tris buffered saline*

TERT: *Telomerase reverse transcriptase*

TRAP: *Telomeric repeat amplification protocol*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VESC: *Vascular endotelial stem cell*

VSC: *Vascular stem cell*

VSEL: *Very small embryonic-like*

IGF: *Insulin growth factor*

FGF: *Fibroblast growth factor*

HSPC: *Hematopoietic stem/progenitor cell*

Introducción

1. Las células madre

Se conoce cómo células madre a aquellas células con capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia uno o varios tipos celulares (Weissman, 2000). Es decir, son capaces de dividirse de forma asimétrica, de forma que una de las células hijas conservará sus características iniciales y la otra se transformará en otro fenotipo celular distinto, más diferenciado.

Se pueden encontrar diferentes nombres para las células madre, como células troncales o progenitoras, pero el uso del término célula madre es el más común en castellano, englobando toda célula con dichas capacidades que se encuentre desde en el embrión hasta en el tejido especializado del individuo adulto.

Se han descrito gran cantidad de tipos de células madre en función de su origen y características. En función de su origen se pueden dividir en dos grandes grupos principales, las células madre embrionarias y las células madre adultas (aquellas presentes en los tejidos del organismo adulto).

Teóricamente, las células madre embrionarias no tienen límites para su autorenovación y diferenciación a cualquier tipo celular (Czyz et al, 2003), pero en la práctica terapéutica son técnicamente difíciles de obtener y su uso puede presentar problemas éticos y legales. En contraste, las células madre adultas pueden ser trasplantadas autólogamente, evitando problemas de rechazo inmune, y su obtención desde un punto de vista técnico, puede ser más sencilla; pero su potencial de proliferación y diferenciación es más restringido.

En función de su potencial de diferenciación se pueden clasificar en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes:

- Totipotentes: Son aquellas que pueden dar lugar a un organismo completo, incluyendo las estructuras extraembrionarias necesarias para su desarrollo. Tan sólo el cigoto y los blastómeros tempranos (aproximadamente hasta el estadio de 4 células) se consideran totipotentes (Mitalipov, 2009).
- Pluripotentes: Pueden diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo, pero no dar lugar a las estructuras extraembrionarias. Entre ellas se encuentran las Células Madre Embrionarias (ESC) obtenidas de la masa interna del blastocisto.

- Multipotentes: Su potencial de diferenciación es más restringido, pudiendo dar lugar a varios tipos celulares. Se pueden encontrar durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos. Se han descrito en la mayoría de los tejidos, ejemplos son las Células Madre Mesenquimales (MSC) (Friedenstein et al., 1974), las Células Madre Hematopoyéticas (HSC) (Spangrude et al., 1988) o las Células Madre Neurales (NSC) (McKay, 1997).
- Unipotentes: Sólo pueden dar lugar a un tipo celular, como las Células Germinales Primordiales (PGC) que dan lugar a los gametos (Donovan et al., 1998), los preadipocitos del tejido adiposo o los progenitores de queratinocitos ubicados en el estrato basal epidérmico. Habitualmente reciben el nombre de progenitores cuando se encuentran en tejidos adultos, como el progenitor de células T, proveniente de las HSC; o progenitor de oligodendrocitos, provenientes de las NSC (Seaberg y van der Kooy, 2003).

2. Células madre mesenquimales

Las MSC son células multipotentes derivadas de la hoja embrionaria intermedia, el mesoderma. Las MSC fueron por primera vez aisladas de la médula ósea hace más de 30 años (Friedenstein et al., 1974), y han sido posteriormente aisladas de otros tejidos, como son el periostio (Zarnett & Salter, 1989; Fukumoto et al., 2003), el hueso trabecular (Kadiyala et al., 1997; Nöth et al., 2002; Tuli et al., 2003), la piel (Toma et al., 2005), los vasos sanguíneos (Sampaolesi et al., 2003), músculo y cerebro (Jiang et al., 2002), membrana sinovial (De Bari et al., 2001) músculo esquelético (Williams et al., 1999; Jankowski et al., 2002), pulmón (Noort et al., 2002), el corazón y el bazo (Hoogduijn et al., 2007), líquido amniótico (In 't Anker et al., 2003), la pulpa dentaria (Gronthos et al., 2000), dientes deciduales (Miura et al., 2003), el cordón umbilical (Erices et al., 2000), el tejido adiposo (Zuk et al., 2001; Gronthos et al., 2001; De Ugarte et al., 2003) y virtualmente de todos los órganos conectivos postnatales. Más aun, las MSCs son una potente herramienta en Medicina regenerativa ya que pueden ser expandidas en cultivo mientras conservan su potencialidad (Pittenger et al., 1999),

siendo capaces de diferenciarse (o transdiferenciarse) en diferentes tipos celulares como osteoblastos (Grigoriadis et al., 1988; Pittenger et al., 1999), condrocitos (Syftestad & Caplan, 1984; Pittenger et al., 1999), adipocitos (Beresford et al., 1992), mioblastos (Wakitani et al., 1995), cardiomiocitos (Ferrari et al., 1998), hepatocitos (Schwartz et al., 2002), células productoras de insulina (Chen et al., 2004) y otras células epiteliales, endoteliales y células nerviosas (Woodbury et al., 2000).

Las células madre adultas más estudiadas y utilizadas en terapéutica hasta la fecha son aquellas derivadas de médula ósea (BM-MSC). La médula ósea humana deriva del mesoderma embrionario y contiene una población de células madre hematopoyéticas (HSCs) sustentadas (jugando un papel vital en la subsistencia, crecimiento y diferenciación de las HSCs) por un estroma mesenquimal (Friedenstein et al., 1968; Paul et al., 1991). El estroma de la médula ósea es heterogéneo en su composición, con varias poblaciones celulares, como células adiposas, células reticulares fagocíticas y células reticulares primitivas, que incluyen a las células madre llamadas células madre mesenquimales (Caplan, 1991). Son células de citoplasma ramificado, con prolongaciones que le confieren un aspecto estrellado. Poseen los orgánulos habituales, con cierto desarrollo del retículo endoplasmático rugoso que les hace algo basófilas. Aunque diversos estudios han demostrado su capacidad de diferenciación a distintos tipos celulares, desde un punto de vista práctico, resulta complicado obtenerlas ya que es necesario acceder a la médula ósea, lo que supone una intervención nada sencilla y muy dolorosa; además de que se obtienen en pequeño número, aproximadamente 1 MSC por 100.000 células adherentes estromales (Bruder et al., 1997; Pittenger et al., 1999), por lo que se necesita una larga fase de expansión *in vitro* para obtener un número con significación terapéutica, lo que aumenta el riesgo de contaminaciones bacterianas y de transformaciones génicas, y por consiguiente, el riesgo de no poder utilizarlas.

2.1. Origen de las células madre mesenquimales

Respecto al origen de las MSC hay diferentes hipótesis planteadas a lo largo de las últimas cuatro décadas. En principio todas coinciden en que del ectodermo primitivo derivado del epiblasto surge el mesotelio primitivo y serán estas células mesoteliales las que iniciarán el viaje hasta el interior de la médula ósea. Brevemente, estas células mesoteliales derivarán en la zona aorta-gónada-mesonefros (AGM) hacia células endoteliales primitivas, células precursoras hematopoyéticas y células epiteliales de transición que darán lugar a células mesenquimales. Se ha sugerido la posibilidad de un origen común, el hemangioblasto (Munoz Chapuli et al., 1999), para las HSCs y las células endoteliales; así como un origen escalonado, el hemoblasto, en el que las células endoteliales derivarían hacia las HSCs. En el primer caso el hemangioblasto derivaría a su vez de estructuras extraembrionarias y mantendría la hematopoyesis temprana, mientras el hemoblasto derivaría de estructuras intraembrionarias y sería responsable de la hematopoyesis tardía.

Una vez en la región AGM existe controversia en el camino que estas MSCs “verdaderas” siguen hasta su aparición en la médula ósea del organismo adulto. Las hipótesis más conservadoras abogan por un desplazamiento conjunto de células mesenquimales y células endoteliales desde la región AGM hacia la parte ventral de la aorta embrionaria, donde se empezarán a formar los vasos sanguíneos (células endoteliales diferenciadas) y junto con su elongación viajarán estos tipos celulares. Estos vasos, mediante invasión de las zonas donde posteriormente se formarán los huesos largos, llevarán las células que irán formando el cartílago primordial para formar el hueso mediante osificación, relleno por las células mesenquimales que formarán el estroma de la médula ósea. Por otra parte, diversos autores sugieren la posibilidad de que entre estas células endoteliales diferenciadas que se encuentran en la zona ventral de la aorta (y que formarán los vasos sanguíneos) hubiera unas células especializadas vasculares llamadas pericitos que serían las que al internarse en la médula ósea darían lugar a las MSCs; hipótesis apoyada por la expresión de marcadores como el Stro-1 en ambos tipos celulares (Bianco & Cossu, 1999). Kucia y colaboradores en el 2006 proponen un sistema de migración diferente, de forma que

desde la región AGM, y debido al descubrimiento reciente de células madre VSEL (*Very Small Embryonic Like*) en la médula ósea adulta, células que expresan SSEA-4 y Oct4 y que responden al gradiente SDF-1, células hematopoyéticas y mesenquimales viajarían juntas, desde el inicio del sistema hematopoyético, pasando por el hígado fetal y desde allí hasta la médula ósea. Otros autores defienden la existencia de transdiferenciación de las HSCs en la médula ósea en MSCs, aunque experimentos de Friedenstein y colaboradores (1974) con trasplante de médula ósea *in vivo* y *ex vivo* sugieren que esta hipótesis no es correcta, así como experimentos más recientes (Gang et al., 2007) en los que al quitar la población mesenquimal SSEA+ en cultivos adherentes de médula ósea (donde, recordemos, encontraríamos también HSCs), éstos mueren a los pocos días. Por otro lado, los experimentos publicados por Anjos-Alfonso & Bonnet en el año 2007 sugieren que de haber transdiferenciación, ésta se daría en sentido contrario, es decir, de MSCs a HSCs, ya que tras la deplección de células CD45+ en la fracción estromal de la médula ósea y el trasplante de estas en ratones con aplasia medular, éstos recuperan, en su médula ósea, células que expresan CD45, a las que llaman “*hematopoietic like cells*”. Sus resultados, aun no siendo concluyentes (la población CD45+ podría haber colonizado la médula desde otras partes del cuerpo, no siendo las MSCs responsables de su formación) sugieren la posibilidad de que las células mesequimales/endoteliales de la región AGM pudieran colonizar el hígado fetal convirtiéndose allí en HSCs. En cualquier caso, estas primeras células MSC/HSC colonizarían posteriormente la médula ósea, y puesto que las MSCs no viajarían por la circulación, HSCs con características mesenquimales dejarían la médula para dirigirse a otros tejidos. De hecho, si asumimos que fibroblastos, miofibroblastos, adipocitos, condrocitos y células óseas pueden derivar de las HSCs (revisado por Ogawa et al., 2010, a partir de experimentos de trasplante de una sola célula) desafiamos la premisa de que estos linajes se originan en las MSCs. De hecho, la gran mayoría de estudios con MSCs se han llevado a cabo en cultivo, o *in vivo*, mediante trasplante dirigido y localizado. Cuando en los experimentos se trasplantan las células sistémicamente, éstas se alojan principalmente en los pulmones (Gao et al., 2001) y, a un nivel mucho más bajo, en las lesiones a tratar (Dazzi et al., 2007). Si estos hechos los combinamos con la falta de marcadores específicos para MSCs tanto *in vivo* como *in vitro*, y con la

falta de ensayos cuantitativos que evalúen la presencia de MSCs en cualquier población dada; parece que las MSCs se definen, al final, por una serie de factores físicos, morfológicos, fenotípicos y funcionales muchos de los cuales no son fisiológicos. Es decir, la existencia de las MSCs como tipo celular específico y particular no está del todo claro, englobando, según las circunstancias del estudio a observar, a fibroblastos, macrófagos, pericitos, o incluso progenitores endoteliales o hematopoyéticos; lo que hace muy difícil precisar con concreción su origen y desarrollo ontogénico.

3. Células madre derivadas del tejido adiposo

El tejido adiposo, como la médula ósea, deriva del mesodermo embrionario y también contiene una población heterogénea de células del estroma (Hausman, 1981; Hausman et al., 1982; Petterson et al., 1984; Petterson et al, 1985; Hauner et al., 1987; Loffler et al., 1987; Varma et al., 2007) entre las que se encuentran las células madre *mesenquimales* [*Adipose Derived Stem Cell*, ADSC; en la literatura se utilizan diferentes nombres y abreviaturas para estas células, pudiendo generar confusión o discrepancias, y a pesar de que el término más aceptado y utilizado últimamente es el de ASC (*adipose stromal/stem cell*), en este estudio se utilizará la abreviatura ADSC por no generar confusiones con el acrónimo ASC (*adult stem cell*) que se refiere a células madre en general, sin importar su origen anatómico]. Como fuente de estas células, el tejido adiposo es una alternativa que permite su extracción en grandes cantidades, mediante un proceso mínimamente invasivo (lipoaspirado). Más aún, un equipo de investigadores de la Universidad de California y de la Universidad de Pittsburg, en 2001, demostraron que una población de células derivadas de tejido adiposo digerido con colagenasa podría ser inducida *in vitro* para diferenciarse en múltiples linajes celulares, incluyendo tejido adiposo, cartílago y hueso (Zuk et al., 2001). Subsecuentes estudios de miembros de este equipo y otros han confirmado y extendido este trabajo demostrando que las ADSCs muestran potencial de diferenciación y con alta eficiencia hacia células del linaje mesodérmico, como adipocitos, fibroblastos, miocitos, osteocitos, condrocitos (Zuk et al., 2002; Mizuno et al., 2002; Wickham et al., 2003;

Gimble et al., 2003; Ogawa et al., 2004), e incluso cardiomiocitos (Rangappa et al., 2003; Bai et al., 2007). Además, las ADSCs también muestran potencial de diferenciación *in vitro*, aunque con menor eficiencia, hacia células no mesodérmicas (Schäffler et al., 2007), como células endoteliales (Wosnitza et al., 2007), neuronas (Zuk et al., 2002; Safford et al., 2002; Ashjian et al., 2003; Ning et al., 2006), hepatocitos (Seo et al., 2005) y células pancreáticas (Timper et al., 2006; Scholz et al., 2009).

3.1. Tipos celulares en la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo

El principal componente celular del tejido adiposo es un conjunto de células llenas de lípidos conocidas como adipocitos, rodeadas por una red de fibras de colágeno. El citoplasma del adipocito maduro contiene aproximadamente un 90% de lípidos. (Patrick, 2004). El otro componente celular del tejido adiposo será el conjunto formado por las células vasculo-estromales, que incluirá células musculares lisas, células endoteliales, fibroblastos, pericitos, células sanguíneas, células nerviosas y preadipocitos (Lanza et al., 2000.) Encontraremos también diferentes precursores en diferentes estados de diferenciación, distintos de los preadipocitos (Rodeheffer et al., 2008), entre los que se encuentran las ADSCs.

El proceso de obtención de las ADSCs se basa en la capacidad de adherencia al plástico de cultivo de las células contenidas en la fracción vasculo-estromal (SVF) del tejido adiposo (Ver M y M). Esta población adherida, que llamaremos PLA (*Processed lipoaspirate*), será heterogénea, reflejo del tejido del que proviene, y solo faltarán las células incapaces de adherirse, como por ejemplo los eritrocitos y leucocitos, o aquéllas con una densidad tan baja que flotarán en el medio de cultivo impidiendo el contacto con el sustrato, como los adipocitos maduros o preadipocitos en proceso de diferenciación con vacuolas lipídicas del tamaño suficiente. Clasificados por su origen anatómico, podremos encontrar adheridos a la placa de cultivo los siguientes tipos celulares (potencialmente todos aquellos presentes en la SVF humana):

Células sanguíneas: Encontraremos granulocitos (que expresarán CD11b+), linfocitos T (CD3+) y B (CD19+), monocitos (CD14+), mastocitos (CD117+) y sus

precusores, todos de origen hematopoyético y por lo tanto CD45+; Entre ellos, aquéllos CD34+ corresponden a precusores (Varma et al., 2007), pero la mayoría de las células CD34+ no son CD45+, lo que sugiere que la mayoría de las células CD34+ no derivan de la sangre periférica sino del propio tejido adiposo (Yoshimura et al., 2006). También células circulantes como fibrocitos o BMPCs (*Blood-acquired mesenchymal progenitor cells*) podrían terminar adheridas a la placa de cultivo, siendo ambos tipos celulares positivos para marcadores mesenquimales (CD90, CD105), pero también hematopoyéticos (CD45), aunque difieren entre ellos en la expresión de CD34 (Zvaifler et al., 2000; Frid et al., 2006).

Células vasculares: Encontraremos células musculares lisas (CD31-/CD146+/actina+), células endoteliales (y sus precusores), las que identificaremos mediante la expresión de CD31 y CD146; además, conservarán con el cultivo la expresión de CD34 y ganarán la de CD105. Y por último, pericitos, que serán CD34-, al contrario que sus progenitores, y también CD31-/CD146+/CD105+ (Yoshimura et al., 2006; Varma et al., 2007; Zimmerlin et al., 2010).

Células estromales: Constituyen el 85% de las células de la SVF que inicialmente se adhieren a la placa de cultivo (Varma et al., 2007). Encontraremos fibroblastos, que son exclusivamente positivos para CD90 y no a otros marcadores típicos de MSCs (Yoshimura et al., 2006); células nerviosas locales que se podrán identificar gracias a la presencia de neurofilamentos, preadipocitos identificados por la expresión de CD24 (Rodeheffer et al., 2008) y MSCs en diferentes estadios de maduración (Yoshimura et al., 2006; y otros muchos autores, ver Discusión), las que no expresarán ni CD45, ni CD31, ni CD24. Sin embargo, es importante recalcar que la expresión de marcadores de superficie en las MSCs estará influenciada por los factores secretados por las células accesorias presentes en los primeros pases del cultivo y que por lo tanto los patrones de expresión *in vitro* no siempre correlacionan con los patrones *in vivo* (Gronthos et al., 2001).

3.2. Caracterización de las ADSCs

Estudios relativamente recientes encontraron que las ADSCs contenidas en la SVF eran similares fenotípicamente a las BM-MSC, creciendo el interés por caracterizar indistintamente dichos tipos celulares.

Gronthos et al. (2001) caracterizaron una población de células cultivadas PLA humanas, encontrando que expresaban las siguientes proteínas de membrana: CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD105, y CD166. No observaron expresión de Stro-1, al contrario que Zuk et al. (2002) que sí lo hacen, además de CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD73, comunes a células estromales de médula ósea y tejido adiposo (Lee et al., 2004). Encuentran diferencias entre la expresión de CD106 (VCAM) positiva para las de médula, y CD49d positiva para las de adiposo. Estos resultados son muy parecidos a los ya descritos para BM-MSCs en la literatura (Conget et al., 1999; Majumdar et al., 2000). De Ugarte et al. (2003) debido a las similitudes en la expresión fenotípica entre las células derivadas del PLA y las BM-MSCs, y el parecido potencial de diferenciación, proponen que ambas serían MSCs, unas periféricas y otras residentes en la médula ósea. Respecto a moléculas de adhesión, las células derivadas del PLA expresarían CD49d ($\alpha 4$ integrina) y CD54 (ICAM), mientras que las BM-MSCs expresarían CD106 (VCAM1) y CD140 (Fraser et al., 2004). La expresión diferente en moléculas de adhesión es explicable por el diferente lugar de residencia de cada una de estas células (Kronenwett et al., 2000). Desde otro punto de vista, Katz et al. (2005) realizó un análisis pormenorizado de genes relacionados con la angiogénesis y la matriz extracelular en células indiferenciadas en pases precoces de PLA. La mayoría de estos genes pertenecían a factores de crecimiento, receptores, proteínas de matriz extracelular y proteasas, todas ellas implicadas en la inflamación, la remodelación de la matriz, la angiogénesis, la organogénesis y la reparación tisular. En cuanto a los marcadores de superficie, como ya se había visto en estudios anteriores, resultaban positivas para HLA ABC, CD29, CD49e, CD51, CD90. En el artículo se hace una clara distinción entre células frescas y células cultivadas por adherencia, ya que ha visto que estas últimas pierden células positivas para linajes hematopoyéticos y endoteliales (CD45, CD14, CD144,

CD34) (Planat-Benard et al., 2004). Sengenès et al. (2005), en un intento por caracterizar los preadipocitos del tejido adiposo subcutáneo, divide los grupos celulares de la SVF (sin cultivar) como CD34+/CD31+ (células endoteliales), CD34-/CD31+/CD14+ (macrófagos residentes), CD34-/CD31-/CD14-, y CD34+/CD31-, siendo estos últimos los responsables de la capacidad adipogénica de la SVF. Además los diferencia de las células mesenquimales porque no expresan CD105, planteando la duda de que haya células predeterminadas a preadipocitos aparte de las células madre de origen mesenquimal (pocos años más tarde, en 2008, Rodeheffer y colaboradores identificaron *in vivo* un progenitor adipocítico temprano fenotípicamente diferente de las ADSCs). También Miyazaki et al. (2005) aísla de tejido adiposo dos poblaciones de apariencia fibroblástica distintas en potencial de diferenciación, aunque fenotípicamente no encuentra diferencias siendo muy positivas para CD13, CD90 y CD105, moderadamente positivas para CD9, CD166 y CD54, y negativas para CD31, CD34, CD66b, CD106 y CD117. Boquest et al., en 2005, divide la fracción vasculostromal (del tejido adiposo) directamente obtenida, sin cultivar, mediante inmunoseparación magnética para obtener las poblaciones CD45-/CD31- y CD45-/CD31+, ambas CD34+ y CD105+; curiosamente, los clones de las células CD31+ no proliferan *in vitro*, expresando moléculas de superficie típicamente endoteliales (además de CD105, CD62P, CD63 y CD146), mientras los clones derivados de la población CD31- proliferan y se diferencian en tejidos de la línea mesodérmica. En esta población cultivada, indiferenciada en pase 4, observaron cómo aumentaba la expresión de CD105 y se perdía la de CD34.

Posteriormente, en el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso un consenso en el que se definían tres criterios mínimos para considerar una población celular como MSC (Dominici et al., 2006). La motivación fue que los diferentes grupos de investigación que trabajaban con MSC utilizaban distintos métodos de extracción, cultivo y caracterización, sin un criterio universalmente aceptado para definir las MSC, con la consiguiente dificultad para comparar y contrastar los estudios publicados. Estos tres criterios mínimos serían válidos para BM-MSC y MSC de otros tejidos, aunque basados principalmente en estudios con BM-MSC: Primero, las MSC deben ser adherentes a plástico en condiciones estándar de cultivo.

Segundo, al menos el 95% de la población de MSC debe expresar (determinados mediante citometría de flujo) los siguientes antígenos de superficie: CD105, CD73 y CD90; y no expresar ($\leq 2\%$ células positivas) CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 ni HLA clase II. Tercero, las MSC deberán poder diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación *in vitro* y demostrarse mediante tinciones específicas. Como ya se ha comentado, estos criterios mínimos se basaron principalmente en los estudios realizados con BM-MSC, aunque los autores defienden la validez de ellos para cualquier MSC, sea cual sea su origen. Pero lo cierto es que existen diferencias en la expresión de antígenos de superficie de las células MSC obtenidas del tejido adiposo, ya sea si se estudian las células presentes en la SVF en fresco o en la SVF previamente cultivada (PLA) (Varma et al., 2007) e incluso respecto al pase celular que se estudie (Vacanti, 2005) o el origen anatómico del tejido adiposo (Yoshimura et al., 2006).

Recientemente, la Federación Internacional de Ciencia de la Terapia Adiposa (IFATS) y la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) han proporcionado una orientación inicial para la comunidad científica que trabaja con células derivadas de tejido adiposo que define los criterios mínimos para la identificación de las ADSCs (Bourin et al., 2013): En la SVF fresca, sin cultivar, las células se deben identificar por la combinación de los siguientes marcadores: CD45⁻, CD31⁻, CD34⁺. Además, se recomienda analizar marcadores estromales como CD13, CD73, CD90 y CD105. En cultivo, como las BM-MSCs, las ADSCs son positivas para CD90, CD73, CD105 y CD44, mientras son negativas para CD45 y CD31. A diferencia de las BM-MSCs, las ADSCs son positivas para CD36 y negativas para CD106. Por último, para permitir la identificación de las ADSCs se debe realizar un ensayo de diferenciación multi-linaje.

En cualquier caso, y a pesar del consenso científico alcanzado en el año 2006 y posteriormente en 2013, es interesante resaltar que más del 90% de las células adherentes de la SVF adquieren el marcador CD105 cuando se cultivan (Yoshimura et al., 2006; Varma et al., 2007), y aunque no se ha encontrado correlación entre la positividad a CD105 (también predominantemente presente en células endoteliales (Cheifetz et al., 1992) y auténticos marcadores de células madre pluripotenciales como Rex-1, Nanog u Oct-4 (Park and Patel, 2010; Wan Safwani et al., 2011), en la mayor

parte de los estudios publicados para uso terapéutico, se ha utilizado la SVF cultivada (PLA) completa (Nicoletti et al., 2015).

3.3. Aplicaciones terapéuticas de las ADSCs

Gracias a la multipotencialidad de las ADSCs, éstas pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones clínicas. Como ya se ha comentado, a diferencia de las ESC, las ADSCs carecen de la capacidad para formar todos los tejidos u órganos del cuerpo, así como regenerar un organismo vivo entero. Por otra parte, la inducción de la diferenciación requiere potentes dosis de factores de crecimiento *in vitro*, e *in vivo* tienden a resistir la diferenciación *in situ*, necesitando generalmente un proceso previo de prediferenciación *in vitro*, como se verá más adelante. Además las ADSCs presentan también otros mecanismos de acción terapéutica, debidos a otras características distintas a la multipotencialidad, que las hacen aún más atractivas para su uso clínico. Podríamos clasificar los diferentes mecanismos de actuación terapéutica en 4 modos de acción diferentes pero complementarios, en los que las líneas de separación permanecen difusas: La siguiente clasificación estará centrada en el aspecto funcional predominante de la aplicación terapéutica a estudiar, procurando ofrecer una visión global pero pormenorizada de los mecanismos de acción de las ADSCs:

3.3.1. Regeneración directa con ADSCs

Las células trasplantadas migrarán a través del tejido dañado del hospedador y bajo la influencia de señales locales se diferenciarán en células del fenotipo requerido, contribuyendo estructural y funcionalmente a regenerar el tejido (Bianco & Robey, 2001; Goodell, 2001; Tuan et al., 2003). Las células, antes del trasplante, pueden ser mantenidas en cultivo y nutridas con diferentes moléculas, como hormonas o factores de crecimiento, para estimular su diferenciación en tipos celulares específicos.

Podemos encontrar en la literatura bastantes ejemplos de aplicaciones terapéuticas que se basan en este mecanismo de acción, destacando por su simplicidad conceptual el uso en la reparación de defectos de tejidos blandos

mediante relleno del defecto con adipocitos derivados de las ADSCs después de mastectomías, lipodistrofias e incluso en aplicaciones cosméticas anti-contorno y anti-arrugas (Yoshimura et al., 2008a y 2008b). Por supuesto, el relleno puede hacerse con injertos de grasa autóloga, pero esta técnica tiene muchas limitaciones, una de ellas, la mala retención del tejido injertado a largo plazo debido a su reabsorción, perdiendo entre el 20 y el 90% del volumen original trasplantado (Tobita et al., 2011). La aproximación a la solución del defecto mediante ADSCs obviaría este problema, mediante la maduración en adipocitos (relleno), diferenciación en fibroblastos, y por la inducción de vascularización que nutriría el injerto gracias a la secreción de VEGF.

3.3.2. ADSCs como biorreactores

Las MSC son capaces de modular el tejido endógeno por medio de la secreción de un amplio espectro de moléculas bioactivas como angiopoyetinas, VEGF, EGF, PGF e interleuquinas (Phinney et al., 2007) que promueven la regeneración tisular gracias a la acción de los progenitores celulares propios del tejido que está dañado. La expresión de estos factores por las MSC induce una gran variedad de respuestas, que incluyen pero no están restringidas a la promoción de la supervivencia y proliferación de los progenitores celulares (ver más abajo) y otros tipos celulares más diferenciados propios del tejido (Prockop, 2007), inducción de angiogénesis (Shyu et al., 2006), inhibición de la respuesta inflamatoria e inmune (ver más abajo), reducción de la apoptosis (Hung et al., 2007) e incluso transferencia mitocondrial (Spees et al., 2006).

Por ejemplo, existen evidencias de que la inyección de ADSCs mejora la función cardíaca post infarto de miocardio, tanto a través de la diferenciación en cardiomiocitos y células vasculares, como a través de factores paracrinos secretados, que aumentan la angiogénesis, reducen las tasas de apoptosis celular y promueven la aparición de células nerviosas en el miocardio dañado (Bai et al., 2010; Cai et al., 2009; Danoviz et al., 2010; Van der Bogt et al., 2009). Otro ejemplo interesante de este mecanismo de acción se da en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Las ADSCs son capaces de diferenciarse en células neuronales y gliales (Jiang et al., 2008; Ryu et al., 2009), pero también son capaces de promover la

regeneración mediante la secreción de algunos factores de crecimiento nervioso: De hecho, las ADSCs expresan una proporción significativamente alta de nestina, marcador de progenitores neuronales (Safford et al., 2002) y secretan, como ya se ha comentado, factores angiogénicos como el VEGF (Rehman et al., 2004) y factores neuroprotectores (antiapoptóticos) como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (Zavan et al., 2010).

Además de las propias moléculas producidas naturalmente por las ADSCs, estas células pueden ser modificadas genéticamente para producir factores paracrinos: Por ejemplo, las citoquinas MDA-7 y PEDF sobreexpresadas en ADSCs sirven como terapia anticancerígena en cáncer de próstata experimental, aprovechando la capacidad innata de estas células de migrar hacia el lugar del tumor (Zolochovska et al., 2011). Del mismo modo, la sobreexpresión de citosindeaminasa:uracil-fosforibosiltransferasa en ADSCs es capaz de inhibir el glioblastoma intracerebral (Altanerova et al., 2011). Para defectos óseos se han usado células genéticamente manipuladas para expresar factores osteogénicos seleccionados para ser implantadas en el sitio anatómico donde se requiere la regeneración ósea. Hasta la fecha, el agente osteoinductor más estudiado y utilizado es el BMP recombinante (Lattanzi et al., 2005; Cook et al., 1995; Einhorn et al., 2003; Groeneveld et al., 2000; Cowan et al., 2005; Dragoo et al., 2003; Miyazaki et al., 2008). Últimamente también se están estudiando y utilizando otros factores de transcripción involucrados en el proceso osteogénico, incluyendo Runx2, VEGF, LMP, SHH, y Nell-1 [Parrilla et al., 2010; Lee et al., 2010; James et al., 2012; Zhang et al., 2012; Boden et al., 1998; Pola et al., 2004; Bernardini et al., 2010; Lattanzi et al., 2008).

3.3.3. ADSCs como reclutadores de progenitores celulares

Varias moléculas secretadas por las ADSCs son responsables del reclutamiento de progenitores celulares al lugar del daño tisular. En regeneración cardíaca por ejemplo, se ha demostrado que las ADSCs son beneficiosas tras infarto de miocardio no sólo debido a su acción angiogénica (Hong et al., 2010) sino también al reclutamiento de células progenitoras del músculo cardíaco que anidan en el

miocardio isquémico contribuyendo a su regeneración (Sanz-Ruiz et al., 2008). Otro ejemplo demostrado de este tipo de acción terapéutica de las ADSCs es su uso cosmético para la reducción de arrugas inducidas por los rayos UVB, efecto mediado por la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la secreción de colágeno de los fibroblastos endógenos de la dermis (Kim et al., 2009). También, el VEGF presente en el secretoma de las ADSCs juega un papel importante en la reparación de fracturas o defectos óseos. El VEGF es capaz de activar la formación de una nueva red de capilares sanguíneos, que se requiere durante el proceso fisiológico de la regeneración ósea (Colnot, 2005). Además, el VEGF juega un papel directo en el reclutamiento de células madre hematopoyéticas que conduce a la formación de nuevo hueso (Ferrara, 2004; Peng et al., 2005).

3.3.4. ADSCs como inmunomoduladores

Se ha comprobado que las MSC procedentes de tejido adiposo no provocan alorreactividad *in vitro* contra linfocitos incompatibles, a la vez que suprimen la respuesta linfocitaria funcional y proliferativa frente a mitógenos (Puissant et al., 2005), e incluso suprimen la diferenciación de las células dendríticas (Ivanova-Todorova et al., 2009). Esta inhibición de la respuesta linfocitaria es estrictamente local, lo que sitúa a las ADSCs como unas candidatas idóneas en la regulación de la respuesta inmune tras el trasplante alogénico (De Miguel et al., 2012). La terapia con ADSCs es capaz de mejorar los síntomas de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias mediante la inhibición de la respuesta inmune periférica, disminuyendo la infiltración de linfocitos T en las zonas afectadas y la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas; además es capaz de promover la aparición de una respuesta tolerogénica aumentando el número de linfocitos T reguladores y la producción de citoquinas antiinflamatorias por parte de éstos (De Miguel et al., 2012). Por otro lado, en individuos trasplantados, la administración sistémica de MSC (generalmente procedentes del donante), previa al trasplante, tanto en monoterapia como en combinación con agentes inmunosupresores como la ciclosporina A, la rapamicina o el micofenolato, administrados de forma subterapéutica, ha demostrado

ser de gran utilidad a la hora de aumentar la supervivencia del trasplante. El mecanismo de acción de las MSC en estos casos parece ser el aumento en la generación de linfocitos T reguladores y de células dendríticas tolerogénicas, así como la prevención de la activación de los linfocitos T. Como ejemplo, se han utilizado en el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad inflamatoria progresiva que afecta a las células mielinizadas del sistema nervioso central. Aunque la etiología de la enfermedad sigue siendo controvertida, hay pruebas convincentes de que el componente principal de la enfermedad es autoinmune (Constantin et al., 2009). Sobre esta base, investigadores clínicos en Costa Rica realizaron ensayos clínicos de seguridad de fase I que tratan a pacientes con esclerosis múltiple con la administración intravenosa de células autólogas ADSCs sin cultivar. En su informe inicial los investigadores explican cómo, tras la infusión celular, todos los pacientes toleraron el tratamiento sin complicaciones e incluso algunos experimentaron una mejoría de los síntomas (Riordan et al., 2009).

4. Hipótesis de trabajo

Diversos autores han demostrado efectos terapéuticos significativos pero subóptimos en varias aplicaciones de las ADSCs, principalmente debidos a las bajas eficiencias de diferenciación en los tipos celulares específicos deseados y/o a los efectos colaterales indeseados provocados por las células indiferenciadas. Por ejemplo, se inyectaron ADSCs humanas en bolsillos corneales en un modelo experimental de daño corneal en conejo; las ADSCs lograron diferenciarse en queratocitos propios del estroma corneal y sobrevivir en el huésped sin sufrir rechazo, sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de ellas consiguieron diferenciarse adecuadamente, por lo que la producción de keratocan en la mayoría de ellas, un proteoglicano específico del estroma corneal que es responsable de la transparencia corneal, no se expresó en cantidades suficientes como para producir la regeneración completa y transparente del grosor del estroma corneal, lo que resultó en una regeneración y una transparencia de la córnea subóptima (Arnalich et al., 2008). En otras aplicaciones diferentes las ADSCs también muestran comportamientos

subóptimos, por ejemplo, se ha observado un mayor porcentaje de arritmias tras el tratamiento con células madre en el infarto de miocardio, lo que sugiere que las células madre adultas fallan al integrarse electromecánicamente dentro del corazón del receptor, por lo que habría que encontrar tipos celulares de segunda generación capaces de lograr este objetivo, ya que es un requisito previo para mejorar eficazmente la función contráctil (Menasché, 2005). También, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la esclerosis múltiple y el Alzheimer, debido a las dificultades para establecer poblaciones homogéneas de progenitores neurales y/o células madre, encontramos efectos terapéuticos limitados (Taupin et al., 2009; Zavan et al., 2010).

Por otro lado, varios autores han identificado subpoblaciones de ADSCs con mayor potencial de diferenciación mesodérmico: Varma y colaboradores, en 2007, observaron que las ADSCs aisladas sin cultivar tenían mayor potencial osteogénico *in vitro* que las mismas ADSCs cultivadas, y que las primeras expresaban CD34 y c-kit, mientras las segundas tendían a perder estos marcadores. Para Rada y colaboradores, en 2011, el mayor potencial osteogénico *in vitro* lo muestran las células Stro-1 positivas, mientras las CD105+/CD29+ poseen mayor potencial condrogénico. Quirici y colaboradores, en 2011, aislaron una subpoblación L-NGFR+ que mostraba incrementados los potenciales adipogénico, osteogénico y condrogénico de diferenciación *in vitro*.

Éstas y otras experiencias similares permiten plantear la hipótesis de que es posible identificar subpoblaciones en la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo humano con mayor potencial de diferenciación *in vitro*, y que éste se corresponde con una mayor capacidad de diferenciación *in vivo* y por tanto con una mayor capacidad terapéutica. Es decir, se podrían mejorar los resultados de los tratamientos optimizando las poblaciones trasplantadas con aquellas células que tienen, al menos *in vitro*, mayor probabilidad de diferenciarse eficientemente en el tejido a reparar, ya sean trasplantadas indiferenciadas o previamente diferenciadas en el laboratorio.

Objetivos

Objetivo principal

Identificar entre las células estromales cultivadas derivadas del tejido adiposo una o varias subpoblaciones con mayor potencial de diferenciación hacia linajes celulares específicos, para mejorar la eficiencia de diferenciación y por lo tanto el efecto terapéutico, así como la disminución de efectos colaterales en el uso medicinal de las ADSCs. Es decir, el objetivo a largo plazo de estos estudios es identificar qué células son las más apropiadas para el uso terapéutico en diferentes aplicaciones en Medicina Regenerativa, de forma que se eviten interferencias no deseadas de las células con poca capacidad de diferenciación, aumentando a su vez la eficacia de los tratamientos de Terapia Celular con estas células madre adultas. Como consecuencia, cabría esperar que la identificación de estas células con mayor capacidad de diferenciación dirigida mejorará la eficacia de numerosos tratamientos de Terapia Celular con células madre adultas, y abrirá también nuevos campos de aplicación.

Objetivos secundarios

1. Identificar una o varias subpoblaciones celulares en el tejido adiposo humano procesado con características típicas de célula madre mesenquimal.
2. Identificar una o varias subpoblaciones celulares en el tejido adiposo humano con alta capacidad de autorrenovación y alta expresión de telomerasa
3. Identificar una o varias subpoblaciones celulares en el tejido adiposo humano con alto potencial de diferenciación *in vitro*.

Material y Métodos

1. Extracción de células vasculo-estromales de tejido adiposo humano

Se obtuvieron 16 muestras de lipoaspirado de mujeres donantes sanas que se sometieron, por razones ajenas a nuestro estudio, a una liposucción electiva previa obtención del consentimiento informado oral y escrito de las pacientes. La edad media de las donantes fue de 38,75 años, con edades comprendidas entre los 25 y los 55 años, y un índice de masa corporal medio de 27,5, en un rango de 26,3 a 29,3. Todas las muestras necesarias para el estudio se extrajeron por liposucción intraoperatoria. Se descartaron infecciones activas por VIH, VHC y sífilis mediante los correspondientes análisis serológicos, siguiendo las directivas del Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos (BOE de 05/07/2014 - Sección I).

Cada muestra de lipoaspirado se procesó según el método establecido (Hauner et al. 1987; Katz et al. 1999) para obtener la fracción vasculo-estromal (SVF). Para obtener la SVF el lipoaspirado fue lavado con igual cantidad de tampón fosfato salino sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (PBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) y digerido a 37°C con suave agitación durante 30 minutos con 0,075% colagenasa tipo I (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) en PBS. La actividad enzimática se neutralizó con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) y un 1% de solución antibiótica de penicilina y estreptomina, (P/S, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) y se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener un pellet de SVF. El pellet fue resuspendido en 160 mM de NH_4Cl , 10 mM de KHCO_3 y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Todos de Sigma, San Louis, MS, USA) e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos con el fin de lisar los eritrocitos contaminantes. La SVF fue recolectada por centrifugación en las mismas condiciones anteriores, sembrada a una densidad aproximada de 30.000 células por cm^2 en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (Éste y todo el plástico de cultivo utilizado fue de

Corning, Corning, NY, USA) y cultivada a 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo (DMEM + 10% FBS + 1% P/S). A las 24 horas el cultivo se lavó con PBS para eliminar las células no adherentes, y la población celular adherida, llamada lipoaspirado procesado (PLA), fue cultivada hasta subconfluencia en las mismas condiciones anteriores, cambiando el medio de cultivo 3 veces a la semana. Después del cultivo, o bien se utilizaron las células directamente, o bien se congelaron en una rampa de congelación de -0,5°C/minuto hasta -80°C en medio de congelación compuesto por un 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, San Louis, MS, USA) en FBS o en medio de cultivo, para sumergirlas después en N₂ líquido y mantenerlas hasta su uso. Las células se registraron y almacenaron convenientemente en el Biobanco del Hospital Universitario La Paz.

2. Extracción de células vasculo-estromales de tejido adiposo de ratón

Ratones de razas Swiss o C57BL/6J de ambos sexos fueron sacrificados por asfixia con CO₂ (Todos los protocolos de experimentación con ratones fueron aprobados por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal del IdiPAZ). Inmediatamente se accedió a la zona inguinal intraperitoneal para recoger los paquetes de tejido adiposo. Se lavaron con PBS y embebidos en él, se cortaron en pequeñas piezas y, tras retirar el exceso de PBS, se digirieron con igual volumen de colagenasa tipo I al 0,09% en PBS a 37°C y con agitación durante 40 minutos. La actividad enzimática se neutralizó con medio de cultivo para después, mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, obtener la fracción celular estromal y sembrarla en medio de cultivo sobre placas de 100 mm de diámetro a concentración variable. Se cultivaron 24 horas a 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo. Después, el cultivo se lavó con PBS para eliminar las células no adherentes, y la población celular adherida fue cultivada hasta subconfluencia en las mismas condiciones anteriores, cambiando el medio de cultivo 3 veces a la semana. Después del cultivo, o bien se utilizaron las células directamente, o bien se congelaron en una rampa de congelación de -0,5°C/minuto hasta -80°C en medio de congelación para sumergirlas después en N₂ líquido y mantenerlas hasta su uso.

3. Obtención de clones celulares

Para obtener clones de ADSCs, las células de la SVF fueron resuspendidas en medio de cultivo estándar a una densidad de 20 células por mililitro y se sembraron 50 μ l sobre cada pocillo en placas de cultivo de Terasaki (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) para cultivarlas durante 16 horas en condiciones estándar. Después, los pocillos que contuvieron una sola célula se cultivaron cambiando el medio de cultivo 3 veces por semana realizando los pases necesarios hasta la muerte de los clones por senescencia no inducida.

4. Extracción de cardiomiocitos fetales de ratón

Para la inducción por cocultivo de la diferenciación *in vitro* hacia el fenotipo cardiomiocítico, la creación de controles positivos y el estudio de comportamiento *in vitro* de progenitores cardiacos, fue necesario obtener cardiomiocitos fetales de ratón: Varias hembras de ratón de razas Swiss o C57BL/6J preñadas de 14,5 días fueron sacrificadas por dislocación cervical (aprobado por el comité de experimentación y bienestar animal del IdiPAZ). Inmediatamente se accedió a la zona inguinal intraperitoneal para recoger los embriones, se separaron de sus placentas y se mantuvieron en PBS mientras se decapitaban bajo lupa binocular y se accedía a la cavidad torácica para extraer los corazones fetales, a los que se les retiró la mayor parte de pericardio para trocearlos en 4 partes y seguidamente someterlos a una digestión con 0,1% colagenasa tipo I y 0,025% tripsina-EDTA (Sigma, San Louis, MS, USA) en PBS durante 5 minutos a 37°C. Después, se pipeteó intensivamente durante 1 minuto para deshacer los grumos celulares hasta un tamaño máximo aproximado de 200 μ m de diámetro. Posteriormente se inhibió la actividad enzimática añadiendo la misma cantidad (volumen) de DMEM suplementado con 10% FBS, 5% suero de caballo (HS), 1% P/S y 0,1% Fungizona (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), para obtener un preparado de corazón fetal compuesto por grumos celulares de diferentes tamaños y células individualizadas que se utilizó para crear cultivos primarios en los experimentos

de inducción del fenotipo cariomiocítico por cocultivo y en los de comportamiento de progenitores cardíacos.

5. Cultivo primario de cardiomiocitos

Parte del preparado de corazón fetal se sembró en pocillos de 2 cm² recubiertos de 0,1% gelatina porcina (Sigma, San Louis, MS, USA) en PBS polimerizada durante 1 hora a temperatura ambiente en la cantidad aproximada de medio corazón por pocillo. Se cambió el medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% FBS, 5% HS, 1% P/S y 0,1% Fungizona) cada 2-3 días durante 7, 14 y 21 días, tras los cuales se procedió a fijar los pocillos con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 15 minutos, después se lavaron con PBS y se conservaron a 4°C hasta su utilización en inmunocitoquímica.

6. Perfusión

Para mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica anti c-kit determinar si las células c-kit⁺ son residentes en el tejido adiposo o provienen de la sangre de la circulación periférica, varios ratones fueron anestesiados con una mezcla de Ketolar (0,01ml por cada 10g de peso corporal) y Domtor (0,005ml por cada 10g de peso corporal; ambos de Pfizer, NY, USA) para mediante cirugía torácica acceder al corazón, en el cual se insertó una cánula a través del ventrículo derecho por la que se bombeó de forma constante PBS a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se practicó una pequeña incisión en la aurícula izquierda para drenar la sangre desplazada por el PBS (aprobado por el comité de experimentación y bienestar animal del IdiPAZ). Cuando el líquido drenado apareció transparente, momento en el que se produjo la muerte del animal por exsanguinamiento, se extrajeron, procesaron y cultivaron las células adherentes del tejido adiposo inguinal de la forma ya descrita.

7. Inmunohistoquímica

Pequeñas piezas de tejido adiposo tanto de humano como de ratón se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS durante 24 horas, se deshidrataron y embebieron en parafina para hacer cortes al microtomo (Leica Biosystems Nussloch, GmbH, Nussloch, DL) de 5 μ m y depositarlos sobre porta objetos recubiertos de silano.

Los porta objetos fueron incubados a 56°C durante 24 horas y rehidratados, para más tarde incubarlos durante 20 minutos con 3% H₂O₂ en metanol para inhibir la peroxidasa endógena y 20 minutos con ácido cítrico 1M para inhibir la fosfatasa endógena. Para bloquear los epítomos inespecíficos, los tejidos fueron incubados durante 30 minutos con 1% BSA y 5% suero de cabra en tampón Tris ((HOCH₂)₃CNH₂) salino 0,02M (TBS). Más tarde, los portas fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 hora en 1% BSA en TBS con anti c-kit (1:100) anti humano y anti CD31 (1:200; ambos de Dako), o anti c-kit (1:200) anti ratón (eBioscience, San Diego, CA, USA). Después los portas fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con TBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con TBS + 1% BSA incluyendo uno de los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con biotina, según fuera necesario: anti conejo o anti ratón (ambos de Vector Labs, Burlingame, CA, USA; y a concentración 1:100). Luego se lavaron 3 veces 5 minutos con TBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con complejo avidina-peroxidasa y complejo avidina-fosfatasa alcalina, (ambos de Vector Labs, Burlingame, CA, USA) en TBS + 1% BSA. Más tarde se lavaron dos veces con TBS durante 5 minutos y una vez más con 0,05M Tris-HCl pH: 7,6 durante otros 5 minutos. Después la reacción inmunohistoquímica fue revelada con un kit de diaminobencidina (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) y con Fast Red (Sigma) durante 10 a 15 minutos y lavada durante 5 minutos con agua destilada, después con agua del grifo otros 5 minutos. Luego, los porta objetos fueron contrateñidos con Hematoxilina de Harris (Dako A/S, Glostrup, DK), deshidratados y montados con DPX (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK).

8. Inmunocitoquímica

Para valorar el éxito de las diferenciaciones muscular, cardíaca, neuronal, pancreática y hepática, se puso de manifiesto mediante inmunocitoquímica o bien la presencia de actina sarcomérica, o bien de GATA4, troponina cardíaca y actina cardíaca, o bien de antígeno S100, o bien de insulina, o bien de albúmina (respectivamente): Los pocillos previamente fijados fueron lavados con PBS durante 10 minutos y después se incubaron o con ácido cítrico 1M (Merck) durante 15 minutos o con 3% H₂O₂ en metanol (Merk) durante 20 minutos para inhibir o la fosfatasa alcalina endógena o la peroxidasa endógena. Después de lavar los pocillos dos veces durante 5 minutos con PBS se procedió a bloquear los epítomos inespecíficos durante una hora con PBS suplementado con 0,1% de Tween-20 y 10% de suero de caballo o de cabra según lo indicado en cada caso. Posteriormente, los pocillos se incubaron dos horas en PBS con uno de los siguientes anticuerpos: Anti-actina sarcomérica (Dako) en dilución 1:100 o anti-S100 (Dako) en dilución 1:50 o anti-insulina (Dako) en dilución 1:50 o anti-albúmina (Dako) en dilución 1:50 o anti-GATA4 (Novus Biologicals, Cambridge, UK) en dilución 1:100 o anti-TNN2 (Sigma) en dilución 1:100 o anti actina cardíaca (Sigma) en dilución 1:100. Trascorrida la incubación, se procedió a lavar los pocillos dos veces durante 5 minutos con PBS y una tercera durante el mismo tiempo con PBS + 0,1% Tween-20. Después, se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector) adecuado, anti-ratón o anti-conejo diluidos 1:100 en PBS y se lavaron tres veces de la misma forma anterior para añadir o el complejo Avidina-Fosfatasa alcalina o el complejo Avidina-Peroxidasa e incubar durante 30 minutos. Tras dos lavados de 5 minutos con PBS y otro del mismo tiempo con tampón Tris-Cl o a pH: 8,2 o a pH: 7,6 respectivamente, se procedió a revelar la reacción inmunohistoquímica poniendo de manifiesto la actividad fosfatasa alcalina con 40 µl/ml de Naftol fosfato (Sigma) en 1 mg/ml de Fast Red TR (Sigma) en agua destilada. La solución se llevó a pH: 9 y con ella se incubaron las células en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se lavaron con agua destilada hasta retirar por completo el exceso de reactivo. Para revelar las muestras en las que se utilizó el complejo con peroxidasa se utilizó un kit de diaminobencidina (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) durante 10 a

15 minutos y se lavaron durante 5 minutos con agua destilada y después con agua del grifo otros 5 minutos. Cuando fue necesario, las muestras se contratiñeron con Hematoxilina de Harris o de Cole (ambas de Dako) o de Mayer (artesanal, cortesía del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz).

Cuando se utilizó revelado fluorescente (inmunocitofluorescencia), las muestras ya tratadas con el anticuerpo primario fueron incubadas en oscuridad y temperatura ambiente durante 1 hora en PBS + 1% BSA + 1% suero de cabra + 1% suero de conejo que contenía el anticuerpo secundario adecuado para cada caso: anti-ratón conjugado con fluoresceína (FITC) a concentración 1:100 (Dako A/S, Glostrup, DK) o anti-ratón conjugado con Texas Red a concentración 1:100 (Dako) o anti-conejo conjugado con Rodamina a concentración 1:50 (Boehringer Ingelheim, GmbH, DL). Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS + 1% BSA durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, para más tarde contrateñirlas y montarlas con una solución de p-fenilendiamino y glicerol en buffer fosfato salino con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar el núcleo celular (VectaShield, Vector Labs, Burlingame, CA, USA).

9. Análisis y separación celular por citometría de flujo

Las células obtenidas por liposucción y digestión con colagenasa, cultivadas y expandidas, así como las células obtenidas de grasa de ratón, cultivadas y expandidas en las mismas condiciones, se analizaron usando inmunofluorescencia y citometría de flujo. Para las muestras humanas, los cultivos subconfluentes se levantaron con tripsina-EDTA 0,05% a 37°C 5 minutos, después de inactivó la actividad de la tripsina con la misma cantidad de medio de cultivo y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 15% FBS en PBS al que se añadió a concentración 1:10 uno de los siguientes anticuerpos: anti c-kit conjugado con ficoeritrina, anti CD24 conjugado con fluoresceína (ambos de BD, Franklin Lakes, NJ. USA) y anti CD105 conjugado con fluoresceína (Chemicon). Fueron después incubadas en oscuridad a 4°C durante 20 minutos para después lavar dos veces con PBS + 15% FBS, centrifugación a 300 g y eliminación del sobrenadante. El

pellet final se resuspendió en PBS + 1% BSA para adquirir directamente los datos de las células vivas en el citómetro de flujo (BD, Franklin Lakes, NJ. USA) y analizar los resultados con el programa Cell Quest Pro en un ordenador Machintosh. Para separar las subpoblaciones c-kit +/CD105 +; c-kit +/CD105-; c-kit-/CD105 + y c-kit-/CD105-, las muestras humanas en pase 1 se trataron con el mismo protocolo descrito y se analizaron en un citómetro de flujo provisto con separación celular (BD, Franklin Lakes, NJ. USA) para cultivar las poblaciones resultantes separadas en las condiciones habituales para observar las diferencias en su crecimiento, supervivencia y potencialidad. Para las muestras de ratón se realizó el mismo proceso cambiando el anticuerpo primario: Anti c-kit (eBiosciences, clon ACK2) a concentración 1:200, incubando durante 20 minutos a 4°C para después lavar dos veces el exceso de anticuerpo con PBS + 15% FBS y centrifugando en las condiciones anteriores. Después, se incubó durante 20 minutos en oscuridad y a 4°C en el mismo diluyente el anticuerpo secundario: Anti rata conjugado con ficoeritrina (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), lavando como anteriormente y resuspendiendo el pellet resultante en PBS + 1% de BSA para adquirir directamente las células en el citómetro de flujo y analizar los resultados con el programa Cell Quest Pro.

10. Inmuno-separación magnética

Las células obtenidas por liposucción y digestión con colagenasa, cultivadas y expandidas, se dividieron en subpoblaciones diferentes, basándose en la expresión de c-kit (CD117) y CD105, mediante inmuno-separación magnética. Los cultivos subconfluentes se levantaron con tripsina-EDTA 0,05% a 37°C 5 minutos, después se inactivó la actividad de la tripsina con la misma cantidad de medio de cultivo y el volumen resultante se centrifugó a 300 g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 partes (volumen) de PBS con 0,5% BSA y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma, San Louis, MS, USA), una parte de FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA) y una parte de MicroBeads conjugadas con anticuerpo anti CD117 humano (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA), e incubado durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron las células con PBS

suplementado con 0,5% BSA y 2 mM EDTA (en adelante, tampón de separación) y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 partes de tampón de separación y se procedió a pasar la solución celular a través de, primero una malla de 30 µm de poro y después una columna MS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA) sometida a un fuerte campo magnético para obtener la porción celular no unida a anticuerpo. Tras 3 lavados de la columna con tampón de separación, ésta se retiró del campo magnético y tras efluir tampón de separación fresco se obtuvo la porción celular unida al anticuerpo. Posteriormente se repitió el mismo proceso con las porciones celulares obtenidas, pero utilizando el anticuerpo CD105 humano conjugado con MicroBeads (Miltenyi Biotec Inc.) para obtener las cuatro subpoblaciones celulares diferentes que se utilizaron en los protocolos de diferenciación.

11. Cultivos a largo plazo

Las subpoblaciones obtenidas de la separación celular por citometría de flujo se mantuvieron en medio de cultivo cambiándolo dos veces por semana y tripsinizando al llegar a subconfluencia y pasando a nueva placa de cultivo la cuarta parte de las células levantadas y congelando las restantes, hasta su muerte por senescencia no inducida.

12. Índice de proliferación

Para conocer las diferencias en la proliferación de las subpoblaciones obtenidas mediante separación celular por citometría de flujo, éstas fueron cultivadas en condiciones proliferativas para, a los diferentes tiempos de estudio (100, 200 y 300 días de cultivo), ser sembradas a concentración 2×10^4 células por cm^2 y por triplicado, en placas de 24 pocillos. Se incubaron en las condiciones habituales 24 horas para añadir después, el reactivo de marcaje con BromodesoxiUridina (BrdU) del *kit* de proliferación celular (Amersham Cell Proliferation Kit, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) a concentración 1:1000 y continuar la incubación en las mismas condiciones durante 24 horas más. Después se procedió a retirar el medio de cultivo y

a fijar los cultivos con una solución de 95% etanol absoluto (Merk, Darmstadt, Germany) y 5% ácido acético glacial (Merk, Darmstadt, Germany) durante 10 minutos a -20°C, y tras lavar los pocillos 3 veces con PBS, se procedió a revelar la BrdU asimilada por las células siguiendo estrictamente el protocolo del fabricante del *kit*. Brevemente, se añadió anticuerpo anti-BrdU a concentración 1:100 en agua destilada con nucleasa, se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y tras varios lavados con PBS, se añadió anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa a concentración 1:75 en PBS + BSA y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBS se procedió a revelar la peroxidasa con DAB suplementada con Cl_2Ni (provisto por el fabricante) como intensificador del color a concentración 1:1000 durante 10 minutos. Después, se lavaron los pocillos con agua destilada hasta retirar el exceso de reactivo. Tras la contratinción durante 1 minuto con hematoxilina de Harris y posterior lavado con agua corriente, se contaron manualmente los núcleos teñidos en marrón oscuro (positivos para BrdU, células proliferantes) frente a los teñidos en azul claro (negativos para BrdU, células no proliferantes) de al menos 500 células (tomadas al azar) por pocillo y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test de Mann-Whitney U.

13. Cariotipado

Cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación mediante citometría se cultivaron en las condiciones mencionadas para los cultivos a largo plazo durante 30 días, se tripsinizaron y se pasaron a cultivar en DMEM + 30% FBS + 1% P/S durante 24 horas, tras las que se añadió 10mM Hepes (Gibco) y 1 µg/ml de colcemida (Irvine Scientific), para incubar a 37°C durante 3 horas. Después, se lavaron con PBS y se tripsinizaron, se inhibió la tripsina con medio de cultivo para centrifugarlas a 300 g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet resultante se sometió a un choque hipotónico con KCl 0,56% y fuerte agitación durante 25 minutos a 37°C. Se centrifugó a 300 g durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet fue fijado con metanol 3:1 ácido acético echado gota a gota y con agitación durante 10 minutos, tras los que se procedió a echar gota a gota y desde una altura de 10 cm la solución

fijada sobre los porta objetos. Las muestras así obtenidas estuvieron en la estufa a 60°C durante 24 horas, para ser teñidas con la tinción de Leishmann y pasar a ser valoradas por el Servicio de Genética del Hospital Universitario La Paz.

14. Actividad de la telomerasa

La actividad del enzima telomerasa se cuantificó mediante el *kit* de detección TRAPeze XL (Millipore Corporation, Billerica, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 15×10^4 células se lisaron en 200 μ l de Chaps lysis buffer recién descongelado. Tras 30 minutos de incubación en hielo, los lisados se centrifugaron a 12.000 g durante 20 minutos a 4°C para recuperar el sobrenadante. La reacción de amplificación por repetición de los fragmentos teloméricos (TRAP) se llevó a cabo usando el sobrenadante correspondiente a 10.000 células. La extensión de la telomerasa se realizó a 30°C durante 30 minutos, seguida de 38 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cada ciclo con tres pasos: 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. La extensión final se hizo a 72°C durante 3 minutos. La curva estándar se realizó utilizando el control TSR8 del *kit* a diferentes concentraciones. En todas las PCRs se incluyó como control interno un patron, también incluido en el *kit*, de 36 pares de bases. Además, células telomerasa positivas (provenientes del *kit*) se utilizaron como control positivo y tampón de lisis Chaps como control negativo de artefactos de la PCR por la presencia de dímeros de cebadores y/o contaminación desde otras muestras. La actividad TERT se cuantificó mediante el estudio de la fluorescencia emitida por las muestras en placas de 96 pocillos gracias a un lector de fluorescencia (Synergy 4, BioTek Instruments, Winooski, USA).

15. RT-PCR y qPCR

Para estudiar la expresión del gen de la telomerasa, el RNA de muestras de ADSCs c-kit positivas y negativas, así como células de la línea NT2 como control positivo (línea de teratocarcinoma humano en pase 20 que expresa hTERT), se extrajo

mediante TRIzol (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, dos microgramos de cada RNA se retrotranscribieron con el SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, cinco microlitros de cDNA se amplificaron con el kit HotStarTaq DNA polymerase (Quiagen) en un termociclador programado con los siguientes ciclos y pasos: 95°C 15', (94°C 45", 56°C 30", 72°C 45") 40 ciclos y 72°C 7'. Para amplificar el cDNA correspondiente al gen hTERT se utilizaron los cebadores LT5 (5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3') y LT6 (5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3') (Meeran et al., 2010). El producto esperado tiene un tamaño de 145bps y pudo ser analizado tras separar por electroforesis en gel de agarosa 2% 10µl de cada reacción de PCR y tiñendo el gel con bromuro de etidio (1:10.000).

Para cuantificar de manera más precisa los niveles de expresión de hTERT en las células ckit+ y ckit-, se llevó a cabo una PCR cuantitativa. En este caso como control positivo se utilizó cDNA de células Jurkat, una línea celular de linfocitos T inmortalizada, positiva para la expresión de hTERT, en pase 14.

Los cebadores específicos para hTERT en este caso fueron: hT3_FWD (5'-AAATGCGGCCCTGTTTCT-3') y hT3_REV (5'-CAGTGCCTCTTGAGGAGCA-3') (Shen et al., 2009). Para normalizar los niveles de expresión de hTERT en los distintos tipos celulares, se utilizó como gen normalizador β actina, amplificada con los cebadores hACT_FWD (5'-AACCGCGAGAAGATCACCCAGATCATGTTT-3') y hACT_REV (5'-AGCAGCCGTCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'). Se utilizó el *kit* Quantimix Easy Kit (BioTools) y el sistema LightCycler (Roche) para amplificar las muestras.

Para la determinación de los "Crossing Points" en las curvas de amplificación se utilizó el programa LightCycler Quantification Software (Roche) con el método de las derivadas segundas. Para la cuantificación de los niveles de expresión, se ha utilizado la fórmula $EXP(-\Delta C_p \text{ hTERT-Act})$.

16. Inducción de diferenciación condrogénica *in vitro*

Se sembró, por duplicado, utilizando la técnica de cultivo *micromass*, una gota de 10µL de suspensión celular de PLA de 8×10^6 células/mL en medio de cultivo,

transcurridas 5 horas –tiempo suficiente para la adhesión celular a la superficie de cultivo- se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación condrogénica (tomado de Zuk et al, 2001): DMEM, Insulina-transferrina-selenio 1x (ITS, Sigma, San Louis, MS, USA), 0.1µM dexametasona (Merk, Darmstadt, Germany), 50µg/mL ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma, San Louis, MS, USA). Se cultivaron refrescando el medio de diferenciación 3 veces por semana durante 4 semanas. La condrogénesis *in vitro* se confirmó usando la tinción histológica Azul Alcían a pH ácido para revelar la producción de proteoglicanos sulfatados: Los cúmulos de células fueron lavados con PBS y fijados a temperatura ambiente durante 15 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS a pH: 7,4. Después, se lavaron con HCl 0,1N durante 5 minutos, para incubarlos a temperatura ambiente en una solución de Azul Alcían (Merk, Darmstadt, Germany) al 1% en HCl 0,1N hasta el día siguiente, cuando se lavaron dos veces de 5 minutos con HCl 0,1N y un último lavado con agua corriente. Los cúmulos celulares así teñidos se montaron, presionándolos entre portaobjetos y cubreobjetos con el fin de aplanarlos, con Cristal/Mount (Biomedica corp.).

17. Inducción de diferenciación osteogénica *in vitro*

Se sembraron, por triplicado, cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación mediante citometría a una densidad de 2×10^4 células por cm^2 y se cultivaron en medio de cultivo durante 24 horas tras las cuales se cambió el medio de cultivo a medio de diferenciación osteogénica (adaptación de Zuk et al, 2001): DMEM, 10% FBS, 0.1µM dexametasona (Merk, Darmstadt, Germany), 50µg/mL ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma). Se cultivaron refrescando el medio de diferenciación 3 veces por semana, para a las 2, 3 y 4 semanas fijar los cultivos con paraformaldehído al 4% en PBS ajustado el pH a 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para determinar el cambio de fenotipo en los cultivos de 2, 3 y 4 semanas se procedió a revelar la actividad fosfatasa alcalina (AP): Los cultivos fijados se lavaron 3 veces con agua destilada y se añadió 40 µl/ml de Naftol fosfato (Sigma) en 1 mg/ml de Fast Red TR (Sigma) en agua destilada. La solución se llevó a pH: 9 y con ella se incubaron las células en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se

lavar con agua destilada hasta retirar por completo el exceso de reactivo y se procedió a su análisis. En los cultivos sometidos a medio de diferenciación osteogénica durante 4 semanas también se demostró la calcificación de la matriz extracelular mediante tinción de Von Kossa: Las células fueron lavadas con PBS y fijadas a temperatura ambiente durante 60 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS a pH: 7,4. Después, se lavaron en agua destilada y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad con una solución de nitrato de plata al 5% en agua destilada durante 30 minutos. Después las células se lavaron tres veces durante 5 minutos con agua destilada y fueron iluminadas con luz U.V. durante 1 hora a temperatura ambiente.

18. Inducción de diferenciación adipogénica *in vitro*

Se sembraron, por triplicado, cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación mediante citometría a una densidad de 15×10^3 células por cm^2 en pocillos de cultivo y se cultivaron en medio de cultivo estándar durante 24 horas tras las cuales se cambió el medio de cultivo a medio de diferenciación adipogénica (tomado de Lin et al, 2005): DMEM suplementado con 10% FBS, 500 μM Isobutylmetilxanteno (IBMX, Sigma), 1 μM dexametasona (Sigma), 1 μM Indometacina (Sigma). A las 72 horas se refrescó el medio añadiendo insulina 10 μM (Actrapid, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, DK) para a las 24 horas retirar el medio y cambiarlo por medio de diferenciación adipogénica sin insulina. El medio con insulina se añadió, de esta manera, cada 72 horas, lavándolo a las 24 horas con medio sin insulina y se mantuvo este protocolo durante 2 semanas, tras las cuales se reveló la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares mediante tinción Red Oil-O: brevemente, los pocillos se lavaron durante 1 minuto en alcohol isopropílico al 60%, para después añadir 0,5% Red Oil-O (Merk) en alcohol isopropílico al 60% e incubar con esta solución 20 minutos, tras los cuales se procedió a lavar el pocillo con alcohol isopropílico al 60% durante 1 minuto y retirar el exceso de tinte con agua destilada. Las células se contratiñeron con hematoxilina de Cole (Dako) durante 5 minutos y se lavaron con agua corriente hasta retirar el exceso de hematoxilina.

19. Inducción de diferenciación miogénica *in vitro*

Se sembraron, por duplicado, cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación mediante citometría a una densidad de 10^3 células por cm^2 y se cultivaron en medio de cultivo durante 24 horas tras las cuales se cambió el medio de cultivo a medio de diferenciación miogénica (adaptación de Zuk et al, 2001): DMEM, 10% FBS, 50 μM Hidrocortisona (Sigma, San Louis, MS, USA), 10% FBS, 5% suero de caballo (HS, Sigma, San Louis, MS, USA) y 1% P/S. Se mantuvo en las mismas condiciones de cultivo, cambiando el medio 3 veces por semana, durante 45 días, tras los cuales se retiró el medio de los pocillos, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. Para determinar el cambio de fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de actina sarcomérica (Dako).

20. inducción de diferenciación cardiomiogénica *in vitro* por cocultivo en contacto

Cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación inmunomagnética del PLA se marcó mediante incubación con VibraDill rojo o verde (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 1:200 en PBS a 37°C diez minutos, y se sembraron, por triplicado, $7,5 \times 10^3$ células por cm^2 en pocillos de cultivo de 2 cm^2 , inmediatamente se añadió a cada pocillo la cantidad de preparado de corazón fetal de ratón correspondiente a un corazón y se cultivaron en DMEM suplementado con 10% FBS, 5% HS y 1% P/S en condiciones estándar. El medio de cultivo se cambió a las 24 horas y cada 2-3 días durante 21 días, tras los cuales, se realizaron videos para demostrar la presencia de grupos mixtos de células con palpitación espontánea. Posteriormente se fijaron en PFA 4% en PBS durante 15 minutos y después se lavaron con PBS. Para determinar el cambio de fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia en las células de Troponina cardiaca (Sigma, San Louis, MS, USA), actina cardiaca (Sigma) y GATA4, (Novus Biologicals, Cambridge, UK).

21. Estimulación de progenitores cardiomiocíticos de ratón *in vitro*

Se sembraron, por triplicado, la parte correspondiente a un corazón de preparado de corazón fetal de ratón en pocillos de cultivo de 2cm², y 15 x 10³ células de cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación inmunomagnética de PLA en un soporte permeable (*Transwell*, Corning, Corning, NY, USA) superior, cultivando a 37° C y 5% CO₂ en DMEM + 10% FBS + 5% HS + 1% P/S (de forma que ambos tipos celulares compartieran el mismo medio de cultivo sin contactar) durante 6 días en los que se cambió el medio 2 veces. Tras este tiempo, los *transwells* con las células PLA fueron desechados y los pocillos con el preparado de corazón fetal se fijaron con PFA 4% en PBS durante 15 minutos y se lavaron con PBS. Para determinar las diferencias en la estimulación de progenitores se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de GATA4.

22. Inducción de diferenciación cardiomiogénica *in vitro* por cocultivo sin contacto

Se sembraron, por triplicado, cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación mediante citometría a una densidad de 15 x 10³ células PLA en pocillos de cultivo de 2cm² (Corning), y la parte correspondiente a un corazón de preparado de corazón fetal de ratón en el *transwell* superior, cultivando a 37°C y 5% CO₂ en DMEM + 10% FBS + 5% HS + 1% P/S durante 21 días en los que se cambió el medio 2 veces por semana. Tras este tiempo, los *transwells* con el preparado fueron desechados y los pocillos con las células PLA se fijaron con PFA 4% en PBS durante 15 minutos y se lavaron con PBS. Para determinar el cambio de fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de troponina cardiaca, actina cardiaca y GATA4.

23. Diferenciación cardiomiogénica *in vitro* por inducción con 5-azacitidina

Se sembraron, por sextuplicado, cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación mediante citometría a una densidad de 7,5 x 10² células

de PLA por cm^2 en pocillos de cultivo y se cultivaron en condiciones estándar en DMEM suplementado con 10% FBS y 1% P/S durante 24 horas, tras las cuales se añadió al medio de cultivo $3\mu\text{M}$ 5-Azaciditina (5-Aza, Sigma, San Louis, MS, USA). A las siguientes 48 horas, el medio se cambió en la mitad de los pocillos por DMEM +10% FBS +5% HS +1% P/S + $3\mu\text{M}$ 5-Aza, mientras en los pocillos restantes se continuó el cultivo con el medio anterior fresco. Ambos medios se cambiaron cada 2-3 días durante 14 días, tras los cuales los pocillos fueron fijados con PFA 4% en PBS pH: 7,4 durante 15 minutos y se lavaron con PBS. Para determinar el cambio de fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de troponina cardiaca, actina cardiaca y GATA4.

24. Inducción de fenotipo neuroectodérmico *in vitro*

Se sembraron, por triplicado, cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación inmunomagnética a una densidad de 5×10^3 células por pocillo de cultivo de área $0,32 \text{ cm}^2$ (Corning) y se cultivaron (condiciones estándar de temperatura, humedad relativa y concentración de CO_2) en medio de cultivo estándar durante 24 horas tras las cuales se cambió el medio de cultivo a medio de diferenciación neurogénica (tomado de Zuk et al., 2002): DMEM + 20% FBS + 1% P/S + 1mM β -Mercaptoetanol (Sigma). Tras 24 horas, se cambió el medio de cultivo por DMEM-HG + 7,5mM β -Mercaptoetanol durante 3 horas, tras las cuales se lavaron los pocillos con PBS y se fijaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS a pH: 7,4. Para determinar el cambio de fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de antígeno S100 en las células. Como control negativo se utilizaron ADSCs cultivadas en condiciones y medio estándar.

25. Inducción de fenotipo pancreático *in vitro*

Se sembraron, por quintuplicado, 2.500 células de cada una de las subpoblaciones resultantes de la separación inmunomagnética en pocillos de cultivo

de área 0,32 cm² (Corning) y se cultivaron en condiciones estándar en DMEM baja glucosa (DMEM-LG; Gibco) suplementado con un 10% de FBS y un 1% de P/S hasta el día siguiente, cuando se lavaron con PBS y se cambió el medio de cultivo por medio de inducción pancreática (Tomado de Scholz et al., 2009): DMEM, 1% P/S, 2% B-27 (Gibco), 1nM Activina A (Sigma), 10nM Nicotinamida (Sigma), 1mM β -Mercaptoetanol, 2 nM Betacellulina (Sigma), 10nM exendina-4 (Sigma). El medio de diferenciación se refrescó cada 2 días durante una semana, tras la cual se lavaron los pocillos con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS a pH: 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras retirar el fijador se lavaron los pocillos 3 veces durante 5 minutos con PBS. Para determinar el cambio de fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de insulina intracitoplasmática. Como control negativo se utilizaron células ADSCs cultivadas en DMEM-LG + 10% FBS + 1% P/S. La contratinción para los contajes manuales se realizó con Hematoxilina de Harris.

26. Inducción de fenotipo hepático *in vitro*

Se sembraron, por quintuplicado y para cada tiempo de diferenciación, 20.000 células por cm² de cada una de las subpoblaciones celulares resultantes de la separación inmunomagnética en medio de expansión [60% DMEM-LG; 40% MCDB-201 (Sigma); 1% ITS (Gibco); 10⁻⁹ M dexametasona (Sigma); 10⁻⁴ M ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma); 10 ng/ml rhEGF (R&D Systems); 5% FBS (Gibco); 1% P/S (Gibco); 0.6% Glutamax (Gibco). Se añadió también 0,1% Fenol Red (Sigma) para vigilar el pH] sobre 0.1% gelatina porcina en PBS, polimerizada a temperatura ambiente durante 1 hora y se cultivaron en condiciones estándar durante 48 horas, tras las cuales los cultivos se lavaron 2 veces con PBS y se cambió el medio a medio diferenciación: Igual que el de expansión pero sin FBS y con 10ng/ml de factor de crecimiento hepático (HGF, Sigma) y 10 ng/ml de oncostatina M (OSM, Sigma). El medio se cambió cada 2 días hasta la finalización del periodo de diferenciación. Tras 10 días, los cultivos fueron fijados con 4% PFA pH: 7,4 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se retiró el PFA y los pocillos fueron lavados con PBS. Para determinar el cambio de

fenotipo se procedió a poner de manifiesto mediante reacción inmunocitoquímica la presencia de albúmina intracitoplasmática.

27. Cuantificación de las diferenciaciones

Para valorar la eficacia de las inducciones de diferenciación entre las diferentes subpoblaciones (obtenidas tras la separación celular por citometría de flujo o la separación inmunomagnética), los pocillos fijados y contrateñidos de la forma ya descrita, se contaron manualmente las células marcadas y las células sin marcar de al menos 500 células (tomadas al azar) por pocillo y la significancia ($p < 0,05$) se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney utilizando el software de IBM SPSS Statistics 2.0. En el caso de las inducciones miogénica y osteogénica se utilizó un analizador de imagen sobre fotos de 10 campos micrográficos (objetivo 20X) tomados al azar: En cada foto, la densidad de tinción (Densidad óptica) por unidad de superficie fue medida con un analizador de imagen automático (Motic Images Advanced version 3.2, Motic China Group Co., China). La delimitación de las áreas se llevó a cabo manualmente utilizando el ratón del analizador de imagen. Como control negativo se procesaron micrografías de los mismos experimentos en los que no se usó anticuerpo primario y la densidad óptica de estos controles se restó de los valores problema. La significancia ($p < 0,05$) de los datos fue analizada con la prueba U de Mann-Whitney utilizando el software de IBM SPSS Statistics 2.0.

28. Imágenes y vídeos

Todas las microfotografías fueran tomadas por una cámara Nikon (Nikon Corporation, Tokyo, Japón) incorporada a un microscopio invertido Zeiss y procesadas por el programa Nis-elements de Nikon o con un microscopio de campo claro Olympus (Olympus Corporation, Tokyo, Japón) asociado a una cámara Olympus y con un sistema de procesado de imágenes DP de Olympus.

Los vídeos para mostrar las contracciones espontáneas en la diferenciación cardiomiogénica por cocultivo en contacto fueron realizados con una cámara

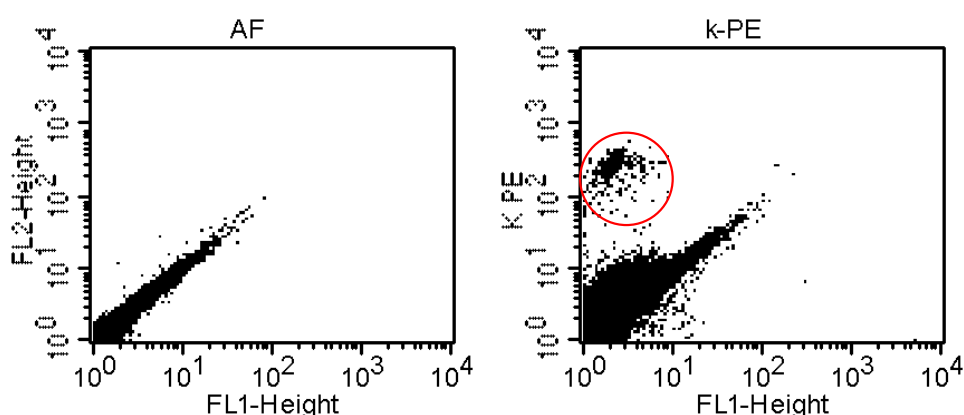
Hamamatsu (Hamamatsu Photonics K.K., Tokyo, Japón) en un microscopio invertido Leica y procesados con el software LAS AF de Leica Microsystems.

Resultados

1. El tejido adiposo humano contiene una proporción constante de células c-kit+

Mediante análisis por citometría de flujo (Figura 1A) de la población PLA de 3 pacientes diferentes en 4 pases correlativos (P.0, P.1, P.2 y P.3) se determinó que la cantidad relativa de células c-kit positivas presentes en los cultivos era constante, no existiendo diferencias significativas ($p>0,05$) ni entre los diferentes pases (Figura 1B) ni entre donantes, siendo la media entre los diferentes pases estudiados de 0,57%.

A:



B:

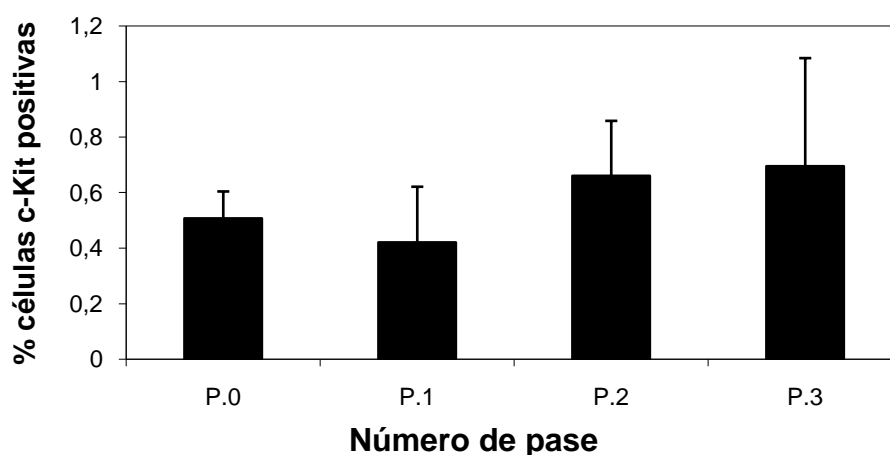


Figura 1: Citometría de flujo de una muestra representativa de la SVF de tejido adiposo humano. (A) Control negativo (panel izquierdo) y células inmunomarcadas con ficoeritrina c-kit (K-PE) positivas (panel derecho, círculo rojo). (B) El porcentaje de células c-kit positivas se mantiene a lo largo de los pases; el gráfico muestra la media y desviación estándar de 3 muestras de donantes diferentes.

2. Parte de la población c-kit expresa también CD105

Mediante doble inmuno marcaje fluorescente y análisis por citometría de flujo (FACS), se aislaron cuatro poblaciones: Células c-kit positivas, células CD105 positivas o células doble positivas o doble negativas para ambos marcadores (Figura 2). La población CD105+, en contraste con la escasa población c-kit+, representa entre el 9% y el 14% del total del PLA; siendo la mayor parte de las células presentes en cada muestra negativas para ambos marcadores.

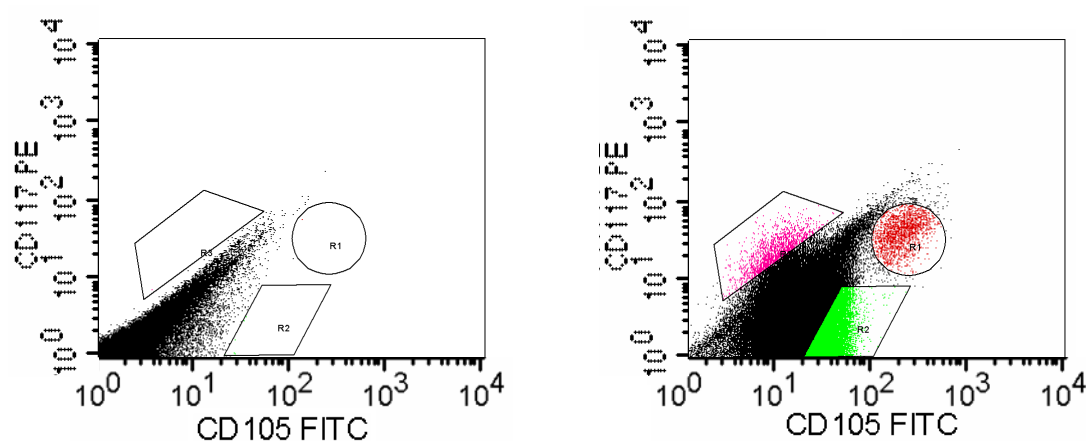


Figura 2: Citometría de flujo de una muestra representativa en fase 1 de PLA humano. (A) Control negativo (panel izquierdo) y células marcadas CD105/c-kit (CD117) con fluoresceína y ficoeritrina respectivamente (panel derecho). R1 (rojo): CD105+/c-kit+. R2 (verde): CD105+/c-kit-. R3 (rosa): CD105-/c-kit+.

3. Las células c-kit tienen capacidad clonogénica

Se aislaron células c-kit positivas mediante FACS y se cultivó una sola célula por pocillo en placas de Terasaki, obteniendo poblaciones clonales (Figura 3) que sobrevivieron en cultivo en fase Log al menos 8 meses. Durante este tiempo, la mayor parte de las células fueron perdiendo la expresión de c-kit, recuperando una proporción (Observación subjetiva -no contabilizada- mediante inmunocitoquímica a

diferentes pases) similar a la presente en la población ADSC completa (ver apartados anteriores).

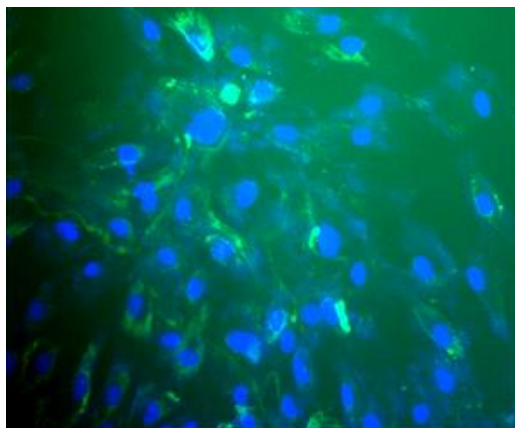
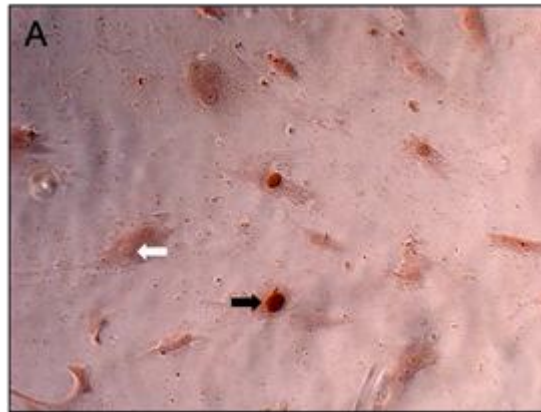


Figura 3: Las células c-kit tienen capacidad clonogénica. *Inmunofluorocitoquímica frente a c-kit (FITC, verde) en un clon derivado de una sola célula c-kit +. Núcleos celulares contrateñidos en azul con DAPI. 200x.*

4. Las células c-kit tienen mayor índice de proliferación y capacidad de autorrenovación

Tras mantener las subpoblaciones aisladas c-kit positiva y negativa en cultivo durante 100, 200 y 300 días, se midió el índice de proliferación mediante incorporación de BrdU. Los resultados (Figura 4 y Tabla 1) muestran mayores índices de proliferación para la población c-kit positiva en todos los tiempos estudiados. Consecuentemente con estos resultados, la población c-kit positiva mostró una fase proliferativa más larga y un tiempo máximo de supervivencia mayor que la población c-kit negativa (Tabla 1). Todas las diferencias observadas, menos el tiempo máximo de supervivencia, fueron significativas (prueba U de Mann-Whitney; $p < 0,05$).



B:

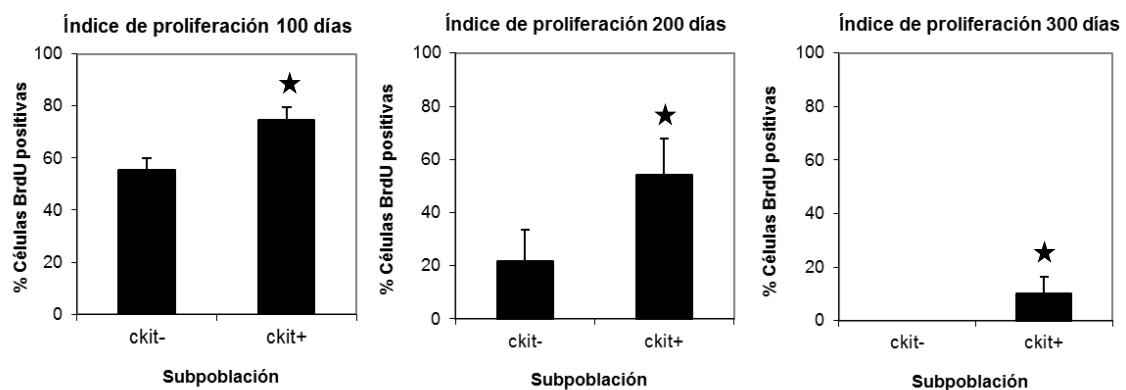


Figura 4: Índice de proliferación. (A) Micrografía óptica de una población c-kit+ a los 300 días. La flecha negra señala un núcleo que ha incorporado BrdU en las últimas 24 horas de cultivo teñido con diaminobencidina y la flecha blanca señala un núcleo de una célula quiescente, no teñido. 200x. (B) Índice de proliferación por incorporación de BrdU de las poblaciones c-kit positiva y negativa a los tiempos indicados. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Las estrellas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

5. Las células c-kit son cariotípicamente estables y no sufren transformaciones espontáneas en cultivos a largo plazo

Se realizaron cariotipos de las poblaciones c-kit positiva y c-kit negativa tras un mes en cultivo, sin encontrar en ninguna de las muestras anomalías cromosómicas numéricas (Figura 5). El bajo nivel de resolución del cariotipo (<400 bandas) no

permitió descartar alteraciones estructurales o mosaicos de baja frecuencia. De todas formas y a pesar de la información limitada que ofreció el cariotipo, ninguno de los cultivos llevados a término (véase el apartado anterior) desarrollaron transformaciones espontáneas (inmortalización).

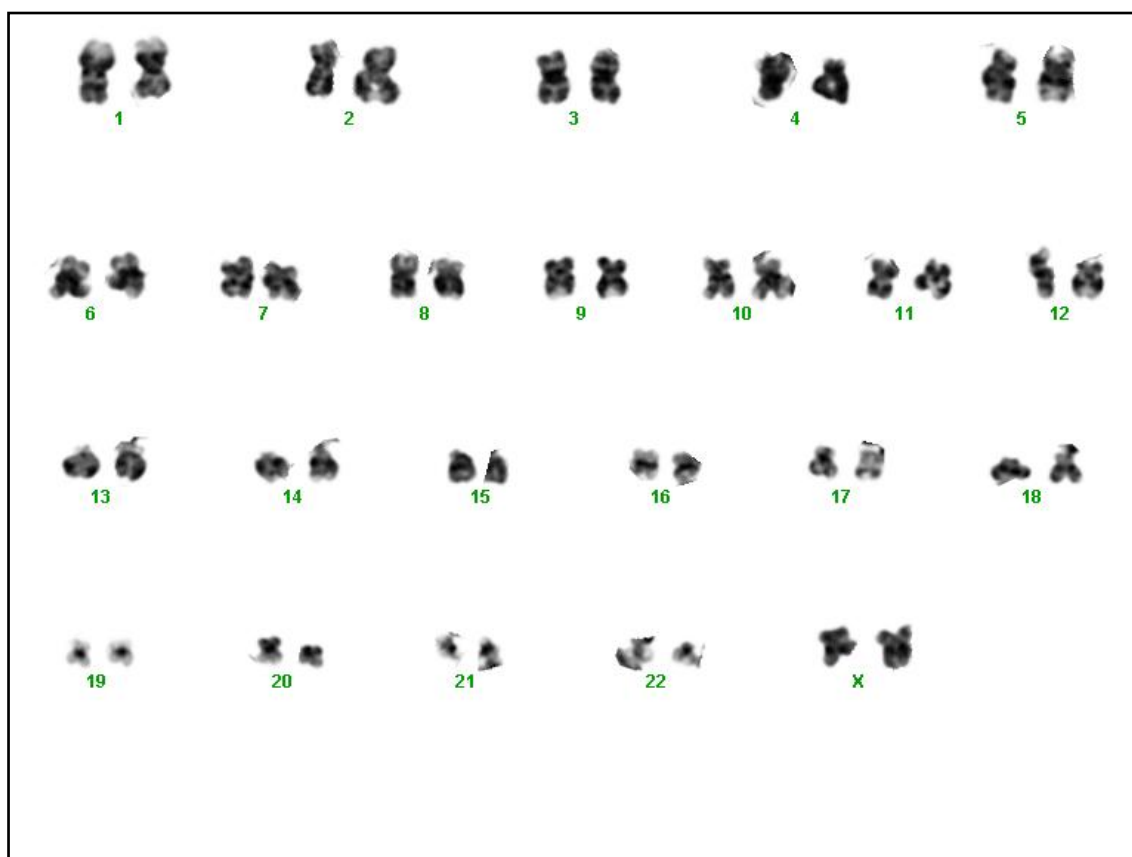


Figura 5: Cariotipo normal femenino de una muestra de ADSCs c-kit +.

6. Las células c-kit muestran mayor actividad y expresión de telomerasa

El mayor índice proliferativo y la mayor capacidad de autorrenovación de las células c-kit positivas sugieren que dicha población puede tener una actividad telomerasa también mayor. Para confirmarlo se procedió a estudiar y medir la actividad telomerasa en ambas poblaciones c-kit, positiva y negativa, confirmando que las células c-kit + muestran mayor actividad telomerasa (Figura 6A y Tabla 1). Más aún, se estudió la expresión de telomerasa mediante RT-PCR (Figura 6B) y se cuantificó

mediante qPCR, demostrando que sólo la población c-kit positiva muestra expresión de telomerasa detectable (Figura 6C y Tabla 1).

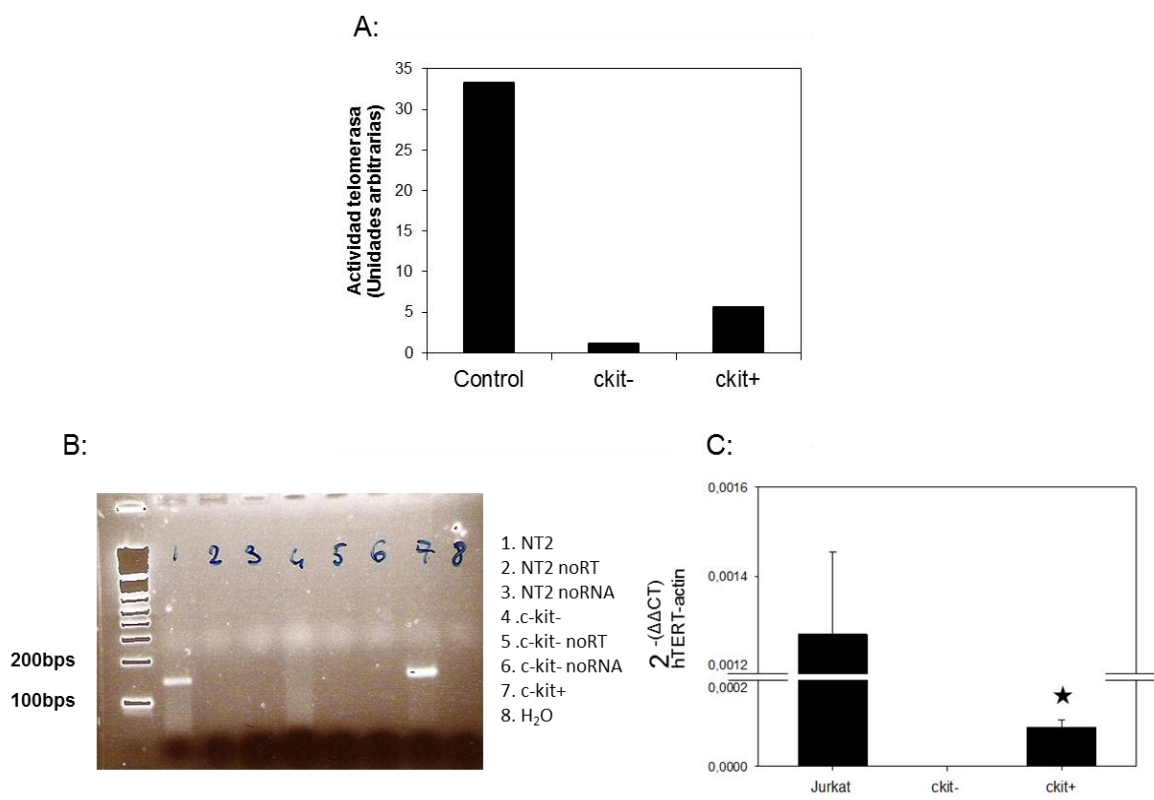


Figura 6: Actividad y expresión de telomerasa. (A) Fluorimetría de la actividad telomerasa, la muestra control pertenece al kit TrapezeXL. El gráfico muestra los datos de un experimento representativo. (B) Gel de agarosa de la RT-PCR de RNA de telomerasa, la muestra control (NT2) es una línea de teratoma de la ATCC. Carril izquierdo: marcador de peso molecular. Demás carriles: leyenda en la imagen. (C) Cuantificación de la expresión de telomerasa mediante qPCR. Se utilizó la línea inmortalizada Jurkat como control positivo. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Las estrellas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	c-kit -	c-kit +
Índice de proliferación 100 días (%)	53,9±4,74	74,77±4,86
Índice de proliferación 200 días (%)	24,62±11,74	54,2±13,47
Índice de proliferación 300 días (%)	0	10,07±6,16
Duración fase proliferativa (días)	160,5±53,63	276±27,56
Supervivencia máxima en cultivo (días)	313,5±53,20	379±71,17
Actividad telomerasa (TPG; u.a.)	1,191083472	5,588703443
Expresión de telomerasa (hTERT-actin; u.a.)	No detectable	0,000068±1,9x10 ⁻⁶

Tabla 1: Valores medios de las características fenotípicas estudiadas de las células c-kit. Los marcos resaltados encierran valores significativamente mayores ($p<0,05$).

7. Las células c-kit en el tejido adiposo se localizan en el espacio estromal perivascular

Con el objetivo de identificar el nicho *in vivo* donde se alojan las células c-kit positivas, se procedió a realizar una reacción inmunohistoquímica frente a c-kit en cortes de tejido adiposo, de humano y de ratón: Las células marcadas se encontraron exclusivamente en el espacio estromal, cerca de los vasos sanguíneos (Figura 7).

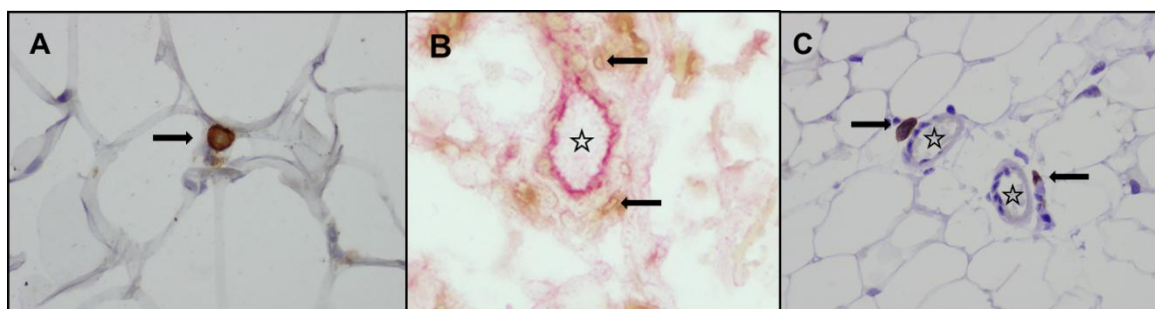


Figura 7: Localización *in vivo* de células c-kit (flechas) y vasos sanguíneos (estrellas). (A) Corte en parafina de tejido adiposo humano e inmunohistoquímica frente a c-kit. Contratinción con hematoxilina. 400x. (B) Criocorte de tejido adiposo humano y doble inmunohistoquímica frente a c-kit (marrón) y CD31 (rojo) para mostrar las células endoteliales del vaso sanguíneo. 200x. (C) Corte en parafina de tejido adiposo de ratón e inmunohistoquímica frente a c-kit. Contratinción con hematoxilina. 200x.

8. Las células c-kit residen en el tejido adiposo

Para descartar la posibilidad de que la población c-kit no residiera en el tejido adiposo y tuviera un origen sanguíneo, se procedió a perfundir PBS a tres ratones hasta extraer completamente su sangre, posteriormente se obtuvo su tejido adiposo inguinal y se procesó para obtener la SVF. La SVF se analizó por citometría de flujo fluorescente frente a c-kit y se demostró que las células c-kit todavía permanecían en el tejido tras la exanguinación (Figura 8).

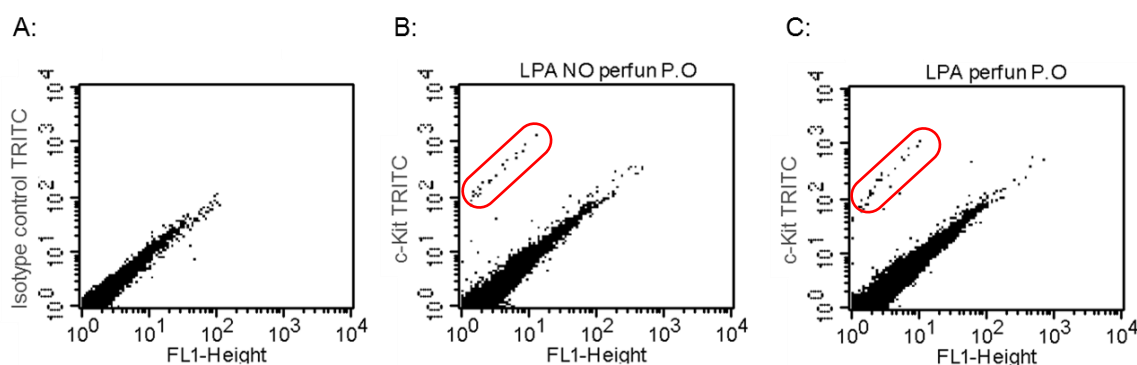


Figura 8: Localización de las células c-kit in vivo. Análisis por citometría de flujo de la SVF de ratón. (A) Control de autofluorescencia. (B) Análisis de la población c-kit (elipse roja) de ratón sin tratar. (C) Análisis de la población c-kit de ratón tras su exanguinación total. Se puede observar la población c-kit remanente (elipse roja) en el tejido adiposo tras la perfusión con PBS.

9. Las ADSCs c-kit+ tienen el potencial de diferenciación osteogénico y miogénico similar al de las ADSCs c-kit-

Para conocer el potencial de diferenciación condrogénico, osteogénico y miogénico de la población c-kit se realizaron experimentos de diferenciación directa mediante inducción bioquímica. Todas las muestras demostraron tener una alta capacidad de diferenciación hacia los tres linajes estudiados (Figura 9A-C), pero al mismo nivel que las células c-kit negativas e independientemente de la expresión de CD105 (Figura 9D, E y tabla 2). La eficiencia de la diferenciación condrogénica no se

pudo cuantificar debido a la técnica *micromass* utilizada. Todos los experimentos se realizaron independientemente y por triplicado.

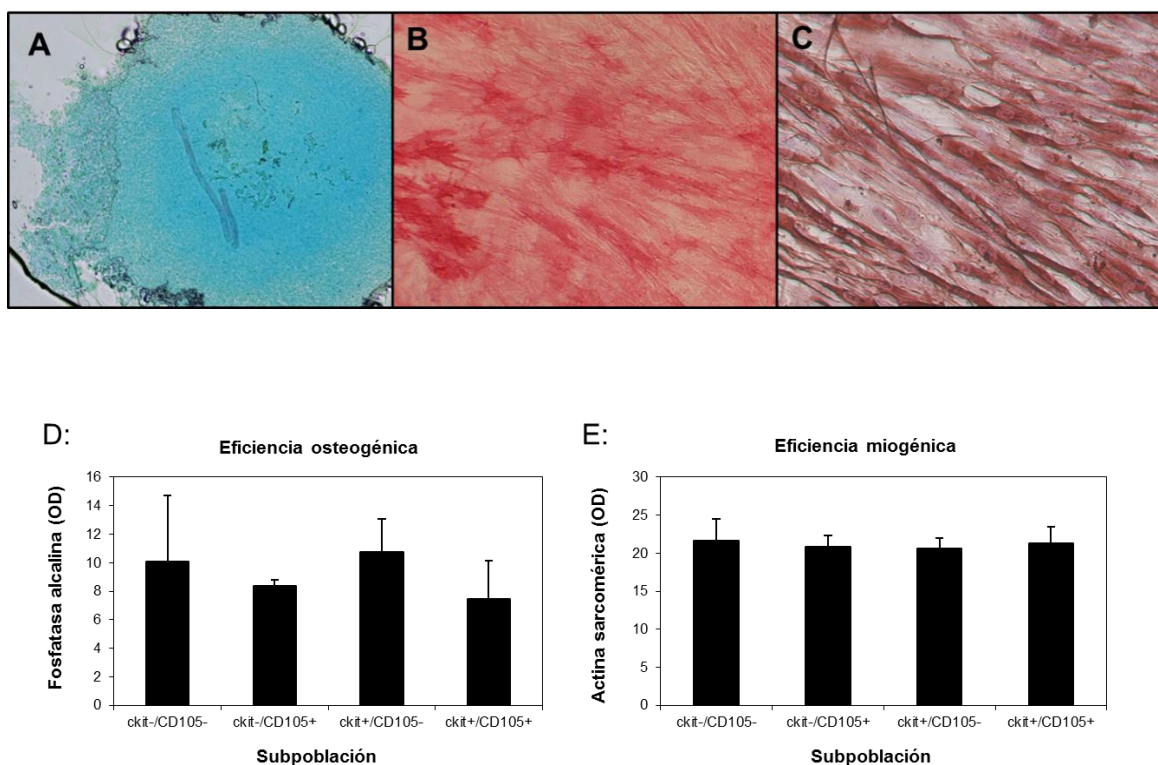


Figura 9: Diferenciación mesodérmica: Fenotipos cartilaginoso, óseo y muscular. (A) Micrografía óptica de un cúmulo de ADSCs c-kit tras la inducción de la diferenciación, mostrando los proteoglicanos sulfatados de la matriz extracelular típicos del tejido cartilaginoso teñidos con azul alcian. 100x. (B) Micrografía óptica de un cultivo de células c-kit tras inducción osteogénica, mostrando las células con actividad fosfatasa alcalina teñidas de rojo con Fast Red. 200x. (C) Micrografía óptica de un cultivo de células c-kit tras inducción miogénica, mostrando las células que desarrollaron actina sarcomérica intracitoplasmática teñidas con diaminobencidina. 200x. (D) Eficiencia osteogénica mediante análisis de imagen de la fosfatasa alcalina tras el proceso de inducción de las poblaciones estudiadas. (E) Eficiencia miogénica mediante análisis de imagen de la actina presente tras el proceso de inducción de las poblaciones estudiadas. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

10. Las ADSCs c-kit+ tienen el potencial de diferenciación adipogénico mayor, pero no son preadipocitos

Las células c-kit positivas también muestran capacidad de diferenciación adipogénica cuando se cultivan en el medio apropiado, desarrollando vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas (Figura 10A) y demostrando significativamente ($p < 0,05$) mayor potencial de diferenciación que la población c-kit negativa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones c-kit +/CD105 + y c-kit +/CD105 - (Figura 10B y tabla 2).

Para comprobar si la población c-kit correlacionaba con una población de preadipocitos CD24+ (Rodeheffer et al, 2008; Berry et al., 2013), se realizó una citometría de flujo fluorescente con doble inmunomarcaje c-kit/CD24 sobre la población total cultivada de la SVF, demostrando ser dos poblaciones diferentes (Figura 10C).

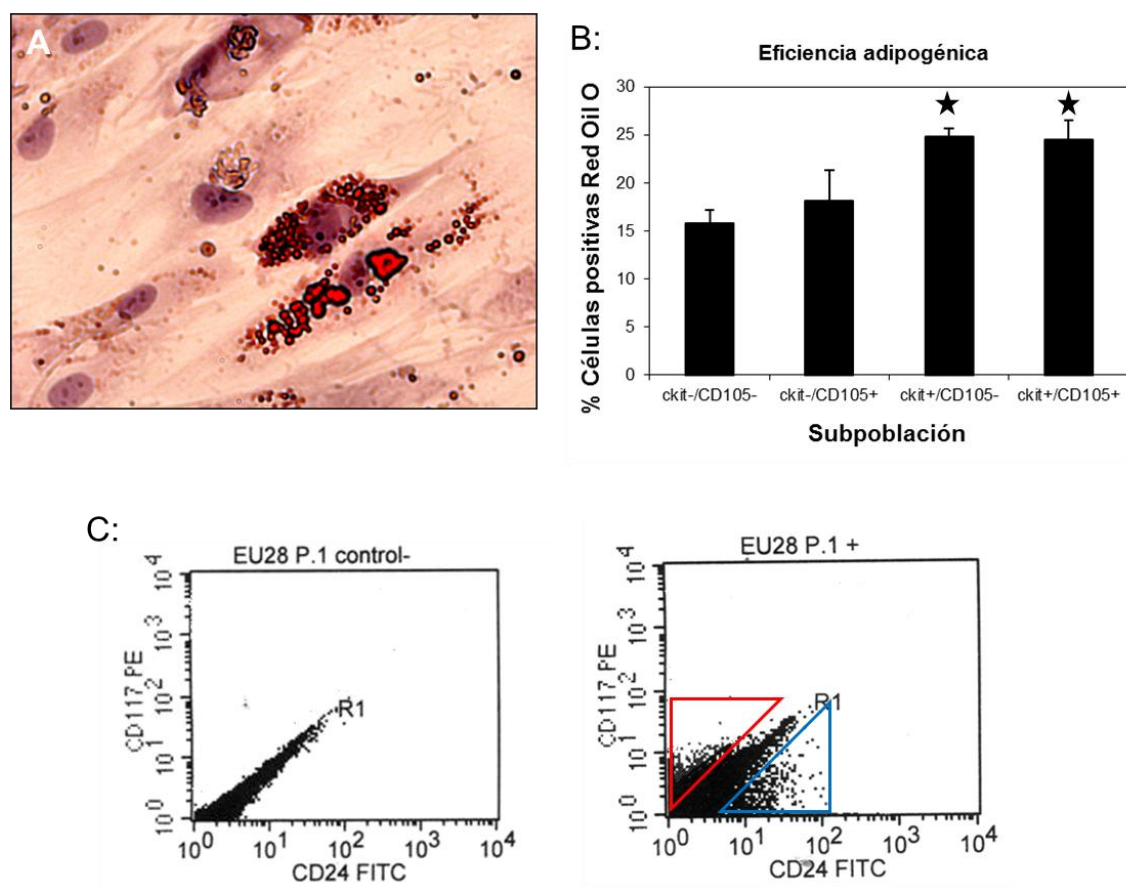
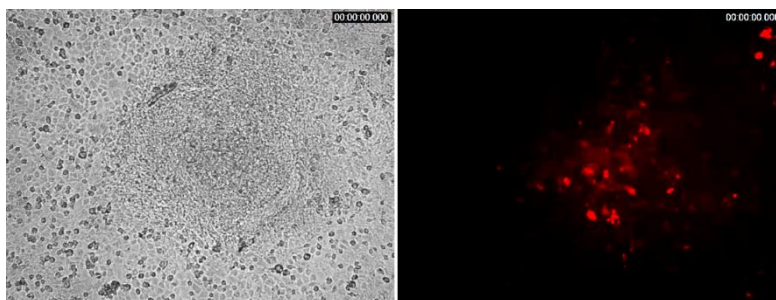


Figura 10: Diferenciación mesodérmica: Fenotipo adiposo. (A) Micrografía óptica de un cultivo de células *c-kit* tras inducción adipogénica. Se pueden observar las inclusiones lipídicas teñidas con Red Oil O (rojo) y los núcleos celulares contrateñidos con hematoxilina (azul). 400x. (B) Eficiencia adipogénica de las ADSCs, en base a la expresión de *c-kit* y CD105, mediante comparación del número de células con inclusiones lipídicas presentes tras la inducción en cada población celular. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Las estrellas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (C) Citometría de flujo fluorescente *c-kit*/CD24. Panel izquierdo: Control de autofluorescencia. Panel derecho: Eje ordenadas: células marcadas con anticuerpo anti *c-kit* conjugado con ficoeritrina (triángulo rojo). Eje abscisas: células marcadas con anticuerpo anti CD24 conjugado con fluoresceína (triángulo azul).

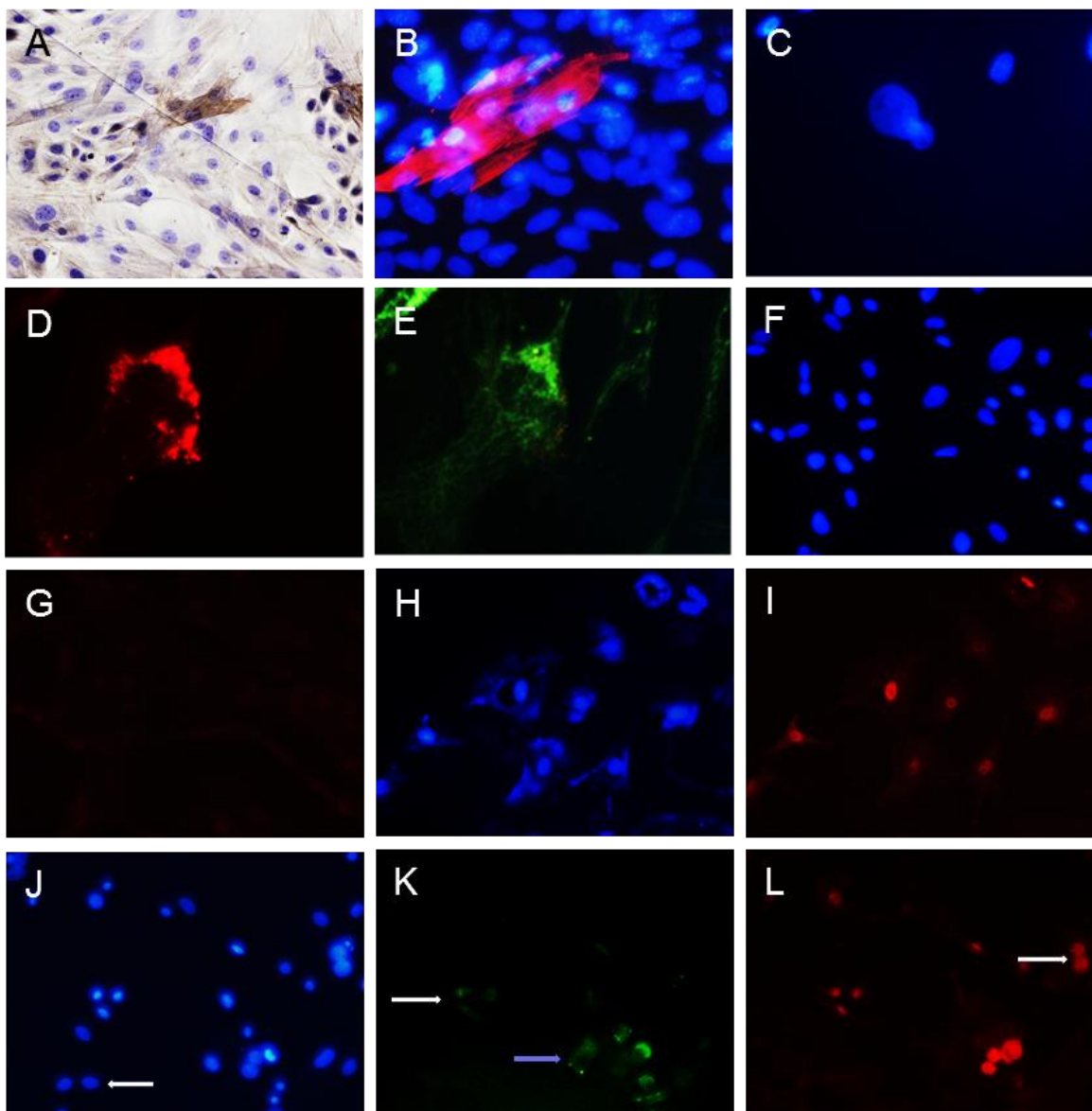
11. Las ADSCs c-kit⁺ ayudan a mantener el fenotipo cardíaco en cultivos primarios de cardiomiocitos embrionarios

Para comprobar la capacidad de las células c-kit para diferenciarse en cardiomiocitos se ensayaron diferentes métodos.

Diferenciación mediante cocultivo: Al cultivar las diferentes subpoblaciones ADSCs junto a los cardiomiocitos embrionarios de ratón se desarrollaron espontáneamente colonias mixtas contráctiles en todos los cultivos (Vídeo 1). El número y distribución de las colonias contráctiles en los cocultivos no revelaron diferencias entre las poblaciones estudiadas. Desde una aproximación inmunocitoquímica, se pudieron identificar en el citoplasma de las células humanas moléculas exclusivas del tejido muscular cardíaco diferenciado, no presentes en otros tejidos, como la actina cardíaca y la troponina cardíaca (Figuras 11A-E). La alta estratificación de las células en las colonias, hizo imposible determinar el número de células humanas que expresaron dichas proteínas. Para intentar solventar el problema, se dispersaron las células por subcultivo en una mayor superficie, de forma que se presentaran en monocapa celular, pero el proceso eliminó selectivamente las células más diferenciadas, impidiendo extraer conclusiones válidas mediante el análisis cuantitativo de la troponina y la actina cardíacas. Se decidió, por lo tanto, estudiarla presencia del factor de transcripción GATA4, proteína reguladora de la función y diferenciación del miocardio, que se encuentra en los núcleos de células progenitoras cardíacas (Figuras 11F-L). Utilizando anticuerpo anti-GATA4 se observó que aproximadamente un 30% (Tabla 2) de las células c-kit mostraban, tras el cocultivo y posterior subcultivo, diferenciación cardiomiocítica, cantidad superior pero no estadísticamente significativa que la de la población c-kit negativa (Figura 11M).



Vídeo 1: Colonia contráctil mixta representativa obtenida por cocultivo de ADSCs c-kit y cardiomiocitos embrionarios de ratón durante 3 semanas. (A) Fotograma del vídeo tomado con contraste de fase de una colonia contráctil en cultivo. (B) Fotograma del vídeo tomado bajo excitación fluorescente de la misma colonia contráctil anterior mostrando las células humanas c-kit teñidas previamente con CM-Dil (rojo) imbricadas con las células no teñidas de ratón. Los vídeos completos se pueden encontrar en el CD anexo.



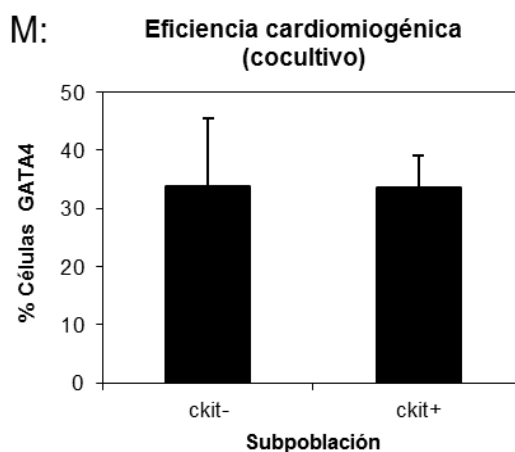


Figura 11: Diferenciación mesodérmica: Fenotipo cardíaco. (A) Micrografía óptica de campo claro tras el periodo de inducción cardiomiogénica por cocultivo. Se pueden observar las fibras de actina cardíaca intracitoplasmáticas inmunocitoquímicamente teñidas con diaminobencidina (marrón) y los núcleos celulares contrateñidos con hematoxilina (azul). 200x. (B) Micrografía óptica de fluorescencia tras el periodo de inducción cardiomiogénica por cocultivo. Se pueden observar las fibras de troponina cardíaca reveladas inmunofluorescentemente con Texas red (rojo) y los núcleos celulares teñidos con DAPI. 200x. (C-E) Micrografías ópticas de fluorescencia de un mismo campo óptico tras el proceso de subcultivo posterior a la inducción cardiomiogénica por cocultivo en los que se puede, aun, observar alguna célula expresando troponina cardíaca. Respectivamente: núcleos teñidos con DAPI, citoplasma de célula humana teñido con CM-Dil (rojo) y fibras de troponina inofluorescentes con fluoresceína. 200x. (F-G) Micrografías ópticas de fluorescencia de un mismo campo óptico de un cultivo de ADSCs tras inmunofluorescencia frente a GATA4. Control negativo. 200x. (H-I) Micrografías ópticas de fluorescencia de un mismo campo óptico de un cultivo de cardiomiocitos embrionarios de ratón tras inmunofluorescencia frente a GATA4. Control positivo. 200x. (J-L) Micrografías ópticas de fluorescencia de un mismo campo óptico tras el proceso de subcultivo posterior a la inducción cardiomiogénica por cocultivo sobre el que se realizó inmunofluorescencia frente a GATA4. 200x. Obsérvese mediante comparación de las tres micrografías: (J) Núcleos celulares teñidos con DAPI (azul), la flecha blanca señala una célula de ratón GATA4 negativa. (K) Citoplasmas de células humanas teñidos con CM-Dil (verde), la flecha azul señala una célula humana GATA4 negativa y la flecha blanca señala un grupo de tres células humanas GATA4 positivas. (L) Núcleos expresando GATA4 inmunomarcados con Texas Red (rojo), la flecha blanca señala dos células de ratón GATA4 positivas. (M) Eficiencia cardiomiogénica por cocultivo en base a la expresión de GATA4 en las poblaciones estudiadas. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

Contrariamente, sí se observó un efecto significativamente positivo ($p<0,05$) de las células c-kit sobre el mantenimiento del fenotipo GATA-4+ en los cardiomiocitos embrionarios de ratón; incluso si, mediante un sistema *transwells* las células humanas y de ratón comparten solo el medio de cultivo (cocultivo sin contacto físico directo entre las células humanas y las de ratón) (Figuras 12A, 12B y Tabla 2).

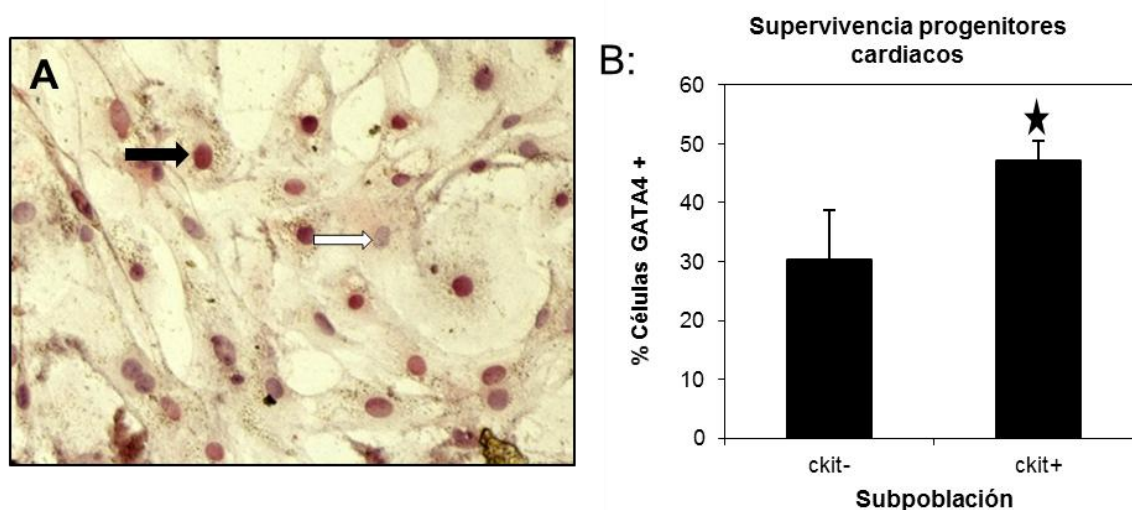


Figura 12: Mantenimiento de progenitores cardiacos. (A) Micrografía óptica de campo claro de un cultivo primario de cardiomiocitos embrionarios de ratón tratado con medio condicionado con ADSCs c-kit + mediante transwells y posterior reacción inmunocitoquímica frente a GATA4, revelada con Fast Red (rojo). La flecha blanca señala una célula GATA4 negativa y la flecha negra una célula GATA4 positiva. Contratinción con hematoxilina. 200x. (B) Eficiencia en el mantenimiento de progenitores cardiacos de ratón mediante medio de cultivo condicionado por las poblaciones humanas estudiadas. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Las estrellas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Diferenciación directa (5-AZA, MethoCult, VEGF): A pesar de no observar expresión de troponina ni actina cardiaca, ni contracciones espontáneas (diferenciación completa) en ninguno de los cultivos, se valoró si la inducción había modificado el fenotipo de las células hacia un estado de diferenciación cardiomiocítica intermedio, encontrando que en aproximadamente un 20% (Tabla 2) de las células c-kit inducidas con 5-azacitidina se expresaba el marcador de diferenciación

cardiomocítica GATA-4 tras la inducción (Figura 13A); cantidad superior a la de la población c-kit negativa pero no significativa (Figura 13B).

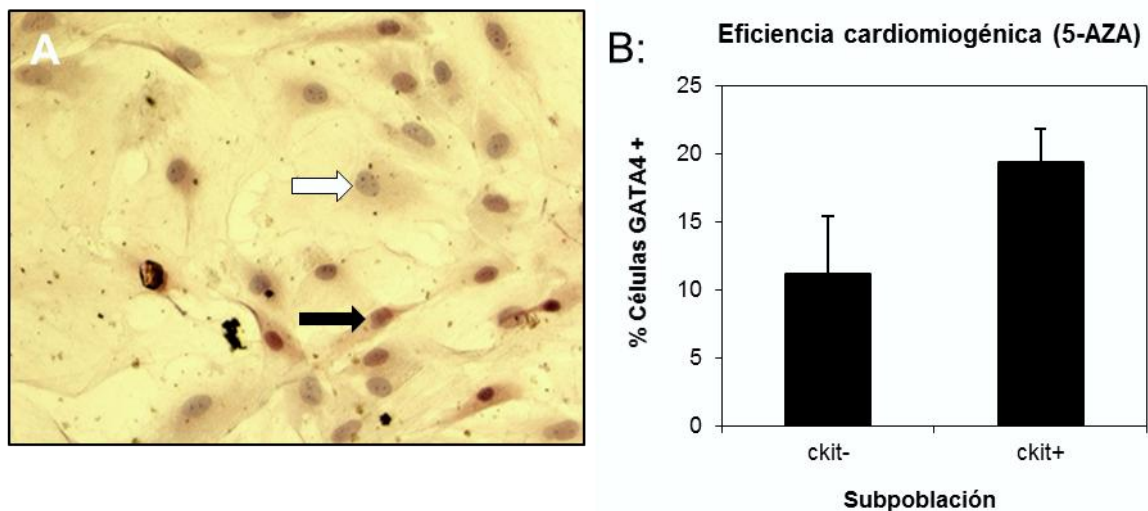


Figura 13: Diferenciación mesodérmica: Fenotipo cardíaco. (A) Micrografía óptica de campo claro de un cultivo de ADSCs c-kit tras el proceso de inducción cardiomiogénico mediante 5-Azaciditina sobre el que se provocó reacción inmunocitoquímica frente a GATA4 y se reveló con Fast Red (rojo); la flecha blanca muestra una célula GATA4 negativa y la flecha negra señala una célula GATA4 positiva. Contratinción con hematoxilina (azul). 200x.

12. Las ADSCs c-kit+ tienen el potencial de diferenciación neuroectodérmico similar al de las ADSCs c-kit-

Para comprobar la capacidad de diferenciación de las células c-kit fuera del linaje mesodérmico, se estudió la eficiencia de estas células para diferenciarse en células propias del linaje ectodérmico.

Se procedió a diferenciar las células c-kit+ y c-kit- mediante inducción directa neurogénica y posteriormente se verificó inmunocitoquímicamente la capacidad para diferenciarse mediante la expresión del antígeno S-100 (Figura 14A). Al comparar las eficiencias de diferenciación entre las poblaciones estudiadas, la población c-kit+ reveló mayor eficiencia media, pero la diferencia no fue significativa ($p > 0,05$) respecto a la población c-kit- (Figura 14B y Tabla 2).

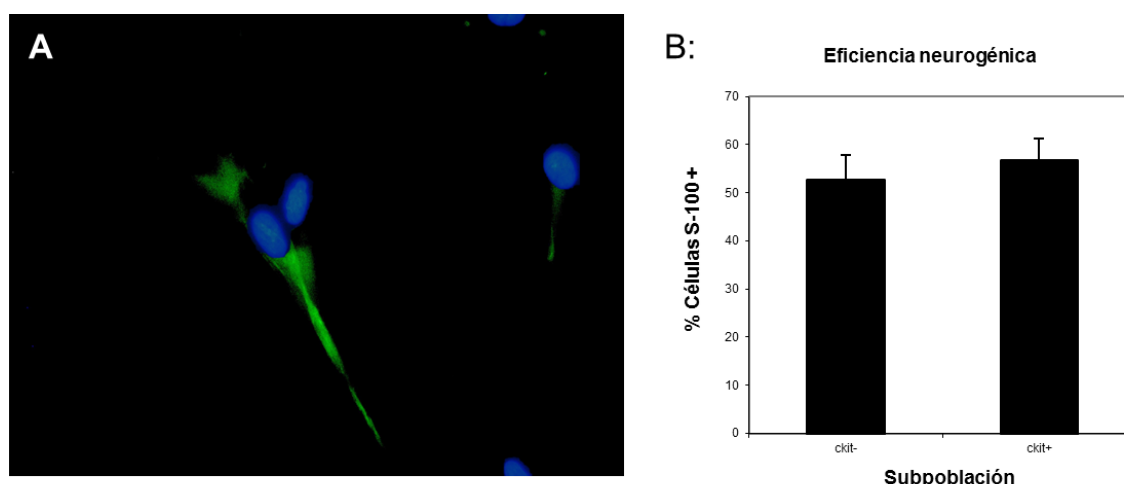


Figura 14: Diferenciación ectodérmica: Fenotipo neuroepitelial. (A) Micrografía óptica de fluorescencia tras la inducción neurogénica y posterior reacción inmunofluorescente frente a S-100. Se pueden observar los núcleos celulares teñidos con DAPI y dos células S-100+. 200x. (B) Eficiencia neurogénica tras el periodo de inducción en base a la expresión de S-100 en las poblaciones estudiadas. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

13. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación pancreático

También se ensayó la plasticidad de las células ADSCs para diferenciarse en fenotipos propios del linaje endodérmico como el pancreático.

Tras inducir a las poblaciones estudiadas con el medio apropiado, se pudieron observar en todos los cultivos células productoras de insulina (Figura 15A). Al medir la eficiencia de la diferenciación, la población c-kit+ demostró significativamente ($p < 0,05$) mayor potencial de diferenciación pancreático que la población c-kit negativa, independiente de la expresión de CD105 (Figura 15B y Tabla 2), demostrando que las población c-kit+ tiene mayor potencial de diferenciación, no solo dentro del linaje mesodérmico, sino también del linaje endodérmico.

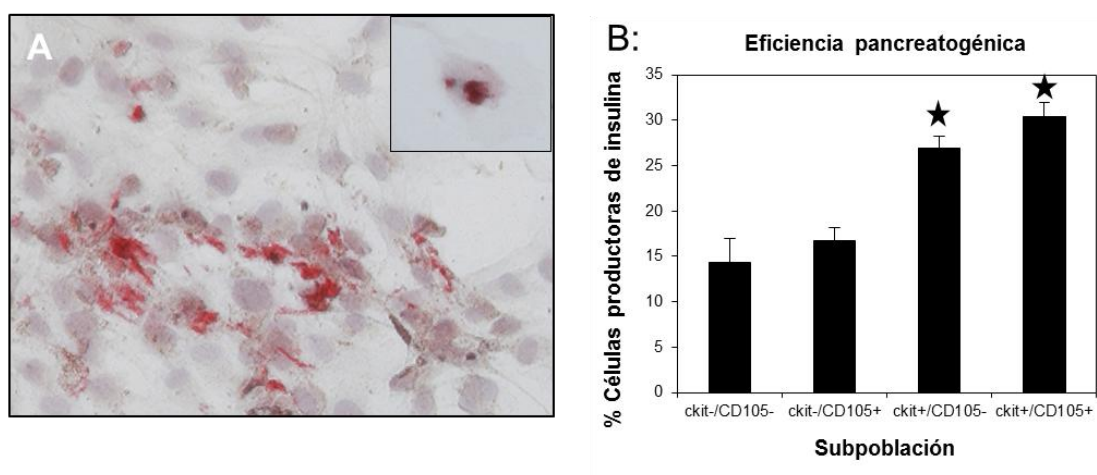


Figura 15: Diferenciación endodérmica: Fenotipo pancreático. (A) Micrografía óptica de un cultivo de células *c-kit*⁺ tras inducción pancreática. Se pueden observar las células productoras de insulina inmunoteñidas con Fast Red (rojo) y los núcleos celulares contrateñidos con hematoxilina (azul). 200x. En el detalle superior derecho de la imagen se puede observar con nitidez una célula mostrando un gránulo de insulina intracitoplasmática. 200x. (B) Eficiencia pancreatogénica de las ADSCs, en base a la expresión de *c-kit* y CD105, mediante comparación del número de células productoras de insulina presentes tras la inducción en cada población celular. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Las estrellas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

14. Las ADSCs *c-kit*⁺ tienen mayor potencial de diferenciación hepático

Para determinar si las células *c-kit* tienen, preferentemente, mayor potencial de diferenciación por los fenotipos endodérmicos, se procedió a ensayar la inducción directa de las poblaciones hacia el linaje hepático (Figura 16A), encontrando, tras una semana de inducción, significativamente ($p < 0,05$) mayor porcentaje de células productoras de albúmina (70%) en la población *c-kit* que en la población *c-kit* negativa, e independientemente de la expresión de CD105 (Figura 16B y tabla 2).

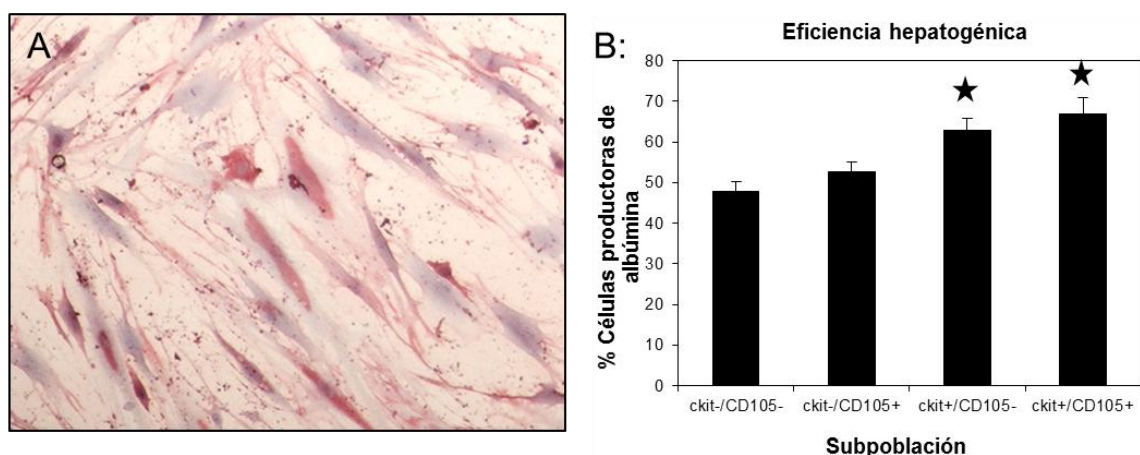


Figura 16: Diferenciación endodérmica: Fenotipo hepático. (A) Micrografía óptica de un cultivo de células c-kit tras inducción hepática. Se pueden observar células con albúmina intracitoplasmática inmunoteñida con Fast Red (rojo) junto a células sin teñir, no productoras de albúmina; contratinción con hematoxilina (azul). 200x. (B) Eficiencia hepatogénica de las ADSCs, en base a la expresión de c-kit y CD105, mediante comparación del número de células productoras de albúmina presentes tras la inducción en cada población celular. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Las estrellas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	c-kit –		c-kit +	
	CD105 -	CD105 +	CD105 -	CD105 +
Osteogénesis (O.D.)	10,078±4,634	8,365±0,412	10,761±2,283	7,478±2,649
Miogénesis (O.D.)	21,674±2,822	20,876±1,415	20,612±1,348	21,302±2,183
Adipogénesis (%)	15,8±1,417	18,133±3,134	24,8±0,916	24,466±2,052
Cardiomiogénesis (cocultivo) (%)	33,76±11,794		33,51±5,642	
Supervivencia progenitores (%)	30,366±8,452		47,153±3,326	
Cardiomiogénesis (5-AZA) (%)	11,19±4,26		19,36±2,47	
Neurogénesis (%)	52,722±5,201		56,844±4,304	
Pancreogénesis (%)	14,296±2,687	16,76±1,36	26,896±1,332	30,433±1,491
Hepatogénesis (%)	47,826±2,459	52,663±2,417	62,836±2,867	66,903±3,981

Tabla 2: Valores medios de las eficiencias de diferenciación y de mantenimiento de progenitores de las subpoblaciones ADSCs estudiadas. Los marcos resaltados encierran valores significativamente mayores ($p<0,05$).

Discusión

1. La subpoblación ADSC c-kit+ muestra características propias de célula madre

En este estudio con muestras humanas se ha demostrado la hipótesis planteada de que existe, al menos, una subpoblación con mayor eficiencia de diferenciación *in vitro* dentro de la heterogeneidad natural de las células del estroma vascular del tejido adiposo, ante la expectativa de que exista correlación entre esta mayor eficiencia *in vitro* y una mayor eficiencia terapéutica. Además se ha demostrado que la subpoblación c-kit+ escogida muestra características propias de célula madre multipotente, como son la gran capacidad de autorrenovación y la alta actividad proliferativa (concordante con la expresión y actividad de la telomerasa obtenidas), la capacidad clonogénica y la capacidad de diferenciación multilínea.

Estudios anteriores han encontrado subpoblaciones de células c-kit+ en la SVF sin cultivar: Prunet-Marcassus et al. (2006), Palpant et al. (2007) y Han et al. (2010) en la SVF de ratón; Bai et al. (2007), Varma et al. (2007), De Francesco et al. (2009), Quirici et al. (2010) y Li et al. (2012) en la SVF humana y en proporciones similares a las obtenidas en nuestro laboratorio, pero estos autores no profundizaron en la caracterización de esta subpoblación ni en su evolución con los pases en cultivo. Zamperone et al, en 2013, aislaron de tejido adiposo de ratón un clon inmortalizado de forma espontánea que expresaba c-kit, y que era capaz de diferenciarse en fenotipos condrogénico, osteogénico, adipogénico y cardiogénico, pero no hicieron comparaciones con la SVF completa. Mangi et al. (2003) en médula ósea, y Beltrami et al. (2003) y Ellison et al. (2013), en tejido cardíaco, encontraron poblaciones de células c-kit+ multipotentes que eran capaces de transformarse en cardiomiocitos. Fang et al. (2012), con células c-kit+ extraídas de la vasculatura pulmonar de ratón, fueron capaces de generar nuevos vasos sanguíneos *in vitro*.

El potencial de diferenciación de otras subpoblaciones de ADSCs se ha caracterizado previamente en numerosos estudios. Sengenès et al. (2007) aislaron una subpoblación (CD34+/CD31-) que podía diferenciarse en el linaje endotelial. Rada et al. (2011) demostraron el mayor potencial osteogénico que exhibían células aisladas Stro-1+ y el mayor potencial condrogénico de las CD105+ y CD29+. Traktuev et al. (2008) encontraron que las ADSCs CD34+/CD31-/CD140+ mejoran la estabilización de las

redes endoteliales cuando se cocultivan con células endoteliales. Quirici et al. (2010) aislaron una subpoblación L-NGFR+ que mostró un aumento en la tasa de proliferación celular, así como una mayor tasa adipogénica, potencial condrogénico y osteogénico, Curiosamente, un alto porcentaje (66%) de L-NGFR también coexpresó c-kit, pero los autores no estudiaron el potencial de diferenciación endodérmico de la subpoblación L-NGFR+.

2. Parte de la subpoblación c-kit+ expresa también CD105

Basándose en el marcador CD45 hematopoyético, el marcador endotelial CD31, el marcador perivascular CD146, y los marcadores de células madre CD34, CD90, CD105, y CD117 (c-kit), se definen cuatro poblaciones distintas en la SVF humana sin cultivar: ADSCs putativas (CD31-, CD34 +/-, CD45-, CD90 +, CD105-, CD117- y CD146-), células endoteliales progenitoras (CD31 +, CD34 +, CD45-, CD90 +, CD105-, CD117 + y CD146 +), pericitos (CD31-, CD34 +/-, CD45-, CD90 +, CD105-, CD117 + y CD146 +), y células hematopoyéticas (CD45 +, algunas de ellas también CD117+) (Varma et al., 2007; Lin et al., 2010; Zimmerlin et al., 2010).

Que sepamos a día de hoy, no hay estudios publicados (excepto el publicado por nuestro grupo: Blázquez-Martínez et al., 2014) que comparen eficiencias de diferenciación entre células que presentan el receptor c-kit con el clásico marcador CD105 en la SVF. En este estudio se han utilizado todas las células ckit+ presentes en la SVF cultivada (aquellas que se adhieren al plástico y permanecen en la placa de cultivo con los pases), encontrando dos poblaciones ckit+, aquellas que son CD105+ (marcador de MSCs) y las que son CD105-. Estudiando las eficiencias en proliferación y diferenciación, no encontramos diferencias significativas entre las dos subpoblaciones ckit+, comportándose independientemente de la expresión de CD105; lo que simplifica la obtención de una subpoblación con mayor potencial al utilizar un solo marcador y sugiere un estadio menos diferenciado en aquellas células que expresan c-kit.

El grupo de Young identificó, en músculo de rata, células madre mesenquimales multipotentes caracterizadas como CD90 y telomerasa positivas, con teóricamente ilimitado potencial de proliferación; pero por otro lado, identifica como progenitores

mesenquimales tripotentes (osteo-condro-adipogénicas) a las células CD105, CD166 y c-kit positivas, las cuales son capaces de doblar (en número) su población unas 8-10 veces (Entre 50 y 70 si hablamos de células humanas) (Young & Black, 2004; Young et al., 2004). En contraste, nuestro estudio encuentra que la subpoblación c-kit⁺ es telomerasa positiva, capaz de doblar su población más de 150 veces y, más aun, capaz de diferenciarse en cardiomiocitos, neuronas, hepatocitos y pancreocitos productores de insulina, además de las clásicas osteo-condro-adipo-miogénesis mesenquimales. Las diferencias entre ambos estudios podrían ser debidas a diferencias tisulares específicas, diferencias técnicas o diferencias entre especies.

3. Las ADSCs c-kit⁺ muestran mayor actividad y expresión de telomerasa

En el presente estudio se ha demostrado la mayor actividad proliferativa y capacidad de auto renovación de las células c-kit positivas frente a las células de la SVF, concordantes con una también mayor expresión y actividad de la telomerasa. Hasta el momento no se había descrito ningún marcador que identificara las células que expresan telomerasa en la SVF humana, tal y como en este estudio no se ha detectado expresión de ARNm de telomerasa en la subpoblación c-kit negativa. En cambio, sí hemos detectado una débil actividad telomerasa en las células c-kit negativas, posiblemente residual, ya que no hemos sido capaces de amplificar el ARNm de la telomerasa en la RT-PCR. De hecho, ni Safwani et al. (2013), ni Sachs et al. (2012) pudieron encontrar ni ARNm ni actividad telomerasa en la SVF cultivada humana, probablemente debido al uso de la SVF completa en sus experimentos y/o al bajo número de células sometidas a la detección. De Francesco et al. (2009), en cambio, encuentra actividad telomerasa en progenitores endoteliales (CD34⁺/CD90⁺) aislados de la SVF humana. Madonna et al. (2008) identificaron una subpoblación de MSCs en la SVF de ratón en base a la expresión de miocardin A (un regulador clave en el desarrollo miogénico cardiovascular) que presentaba expresión y actividad telomerasa; pero tan solo un 8% de las células telomerasa positivas eran también miocardín A positivas.

Por otro lado y en concordancia con nuestros datos, las células cancerígenas muestran mayor actividad telomerasa respecto a las (c-kit+) ADSCs (Jeon et al., 2011). De hecho, uno de los problemas que podrían plantear las células trasplantadas es su transformación en células cancerosas (Li et al., 2007; Røslund et al., 2009; Pan et al., 2014); la subpoblación c-kit positiva, a pesar de la alta capacidad proliferativa y su estado indiferenciado que le confiere la ya mencionada actividad telomerasa, ha resultado ser, al menos *in vitro*, segura en lo que a transformaciones espontáneas se refiere, mostrando también un comportamiento cariotípico estable.

4. Las ADSCs c-kit+ se localizan en el espacio estromal perivascular

De acuerdo con nuestros datos, Zannettino et al. (2007), Traktuev et al. (2008) y Ryu et al. (2013) encontraron que ADSCs multipotentes mostraban una localización similar a la de los pericitos. Además, otros autores han hecho descubrimientos parecidos en cuanto a la localización perivascular de las células madre en múltiples órganos (Da Silva Meirelles et al., 2006; Crisan et al., 2008; Lin et al., 2010; Gerlach et al., 2012).

El hecho de que la población c-kit positiva permanezca en la SVF después de la perfusión con PBS demuestra claramente que la subpoblación c-kit+ ADSC es residente y distinta de los fibrocitos circulantes con potencial adipogénico (Hong et al., 2005). Tampoco pueden ser pericitos (CD34-/CD31-/CD146+/CD105+; ver en introducción ítem 3.1) ya que no está descrito en la literatura que expresen c-kit, siendo más probable que las células c-kit+ que encontramos *in vivo* sean precursores de éstos; es decir, precursores hematopoyéticos/vasculares y/o estadios intermedios de diferenciación entre HSC/VSC y pericitos (ver ítem 10 más adelante). El hecho de que una de las subpoblaciones ADSC c-kit+ exprese también CD105 avala esta hipótesis.

5. Las ADSCs c-kit⁺ tienen el potencial de diferenciación adipogénico mayor, pero no son preadipocitos.

Otros autores han estudiado la eficiencia adipogénica de las ADSCs encontrando resultados variados -Yoshimura et al. (2006) obtienen $29 \pm 7\%$ células teñidas con Oil Red O; Zuk et al. (2001) obtienen $42 \pm 10\%$; Cao et al. (2005) informan de eficiencias mayores del 80%; Sakaguchi et al., 2005 y Wosnitza et al., 2007 de casi el 90%-; más aún, se ha observado una gran heterogeneidad entre donantes, variando desde el 30 al 80% de células Rojo Nilo positivas tras 2 semanas de diferenciación (Sen et al., 2001).

La eficiencia adipogénica de las células diferenciadas en este estudio fue de media un 25%, y obtuvimos la máxima eficiencia con la subpoblación c-kit⁺/C D105⁺, un 65%, significativamente más alta que el resto de la SVF.

En ratones desnudos, Ko et al. (2011) demostraron que la co-inyección de ADSCs con tejido adiposo aumentaba la estabilidad y longevidad de los implantes. Se han realizado varios ensayos clínicos con este procedimiento en seres humanos, principalmente para reconstrucciones faciales o de pecho, utilizando grasa autóloga enriquecida con ADSCs (Yoshimura et al., 2010, 2008a, 2008b; Lee et al., 2012; Gentile et al., 2012; Pérez-Cano et al., 2012). En todos estos estudios, la restauración del volumen fue un éxito y se lograron significativamente mejores resultados que con el trasplante de grasa solo; sin embargo, el volumen se perdió parcialmente después de un año. El uso de la subpoblación c-kit⁺ (tanto CD105 positiva como negativa) con un mayor potencial de diferenciación adipogénico podría mejorar estos resultados.

La demostración de que la subpoblación c-kit⁺ no corresponde con la de progenitores adipogénicos específicos -preadipocitos CD24⁻ y la plasticidad multipotencial de estas células sugieren un origen ontológico más temprano de las células c-kit⁺.

6. Las ADSCs c-kit⁺ ayudan a mantener el fenotipo cardiaco en cultivos primarios de cardiomiocitos embrionarios

Por cocultivo con cardiomiocitos embrionarios de ratón, encontramos una media de 37% en la eficiencia de diferenciación cardiomiogénica. Otros autores han logrado una eficiencia algo menor (Gaustad et al., 2004; Metzele et al., 2011) cuando cocultivaron con cardiomiocitos de rata, neonatales o adultos. Aunque no se encontraron diferencias entre las subpoblaciones estudiadas, sí demostramos mayor eficiencia media de diferenciación cuando se cocultiva con cardiomiocitos embrionarios en lugar de con cardiomiocitos neonatales o adultos -más diferenciados-. Este hecho podría utilizarse para mejorar los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* de regeneración cardiaca, porque las células que cuentan con un verdadero fenotipo cardiomiogénico son las que tienen el potencial de garantizar una verdadera regeneración del miocardio perdido (Menasché, 2005). De hecho, la sustracción de los progenitores cardiacos residentes c-kit⁺ del tejido cardiaco abolió la regeneración cardiaca y la recuperación funcional en un modelo experimental de infarto de miocardio en ratón (Ellison et al., 2013). Hemos logrado hasta el mantenimiento del 45% del fenotipo progenitor cardiaco cuando dichos progenitores embrionarios se cultivan con ADSCs c-kit⁺ en *transwells*; por lo tanto, el sobrenadante de las células c-kit⁺ de la SVF podría tener un papel cardioprotector *in vivo*. De hecho, uno de los efectos básicos de las células mesenquimales es secretar una amplia variedad de factores de crecimiento, lo que probablemente las hace más adecuadas para mejorar la angiogénesis paracrina y atraer progenitores que para la generación de células intrínsecamente contráctiles (Murry et al., 2004; Alvarez-Dolado et al., 2003; Kinnaird et al., 2004; Paul et al., 2012; Kim et al., 2012; Li et al., 2012). Curiosamente, la población de células c-kit⁺ cardiacas aumentan en respuesta a la lesión isquémica y contribuyen a la cardioprotección *in vivo* (Altarche-Xifró et al., 2009). Además, cuando la SVF se cultiva previamente con medio condicionado de cultivos de cardiomiocitos (Bai et al., 2007) o con medios suplementados específicamente con EGF y PDGF (Chang et al., 2011), se encuentra mayor porcentaje de células c-kit⁺, y estas células mejoran la función miocárdica en ratas infartadas (Chang et al., 2011). Nuestros datos

también apoyan el uso de ADSCs como una valiosa herramienta de terapia celular para la cardiopatía isquémica; y más concretamente las ADSCs c-kit+, especialmente a través de los factores que secretan.

7. Las ADSCs c-kit+ tienen el potencial de diferenciación neuroectodérmico similar al de las c-kit–

A pesar de que la eficiencia de diferenciación entre las subpoblaciones no es significativamente diferente, se demuestra la capacidad de diferenciación hacia linajes ectodérmicos de las ADSCs. La cuestión de la posible transdiferenciación neural de las MSC es todavía debatido y controvertido (Neirinckx et al., 2013; Hu et al., 2013; Bai et al., 2013), proponiéndose incluso que ésta es debida a la contaminación del cultivo por precursores específicos neuroectodérmicos presentes en el estroma vascular del tejido adiposo y por tanto en la SVF (Young et al., 2004). El hecho de que la subpoblación ADSC c-kit+ estudiada sea una población purificada contraviene directamente esta hipótesis. Es más, la evidencia convergente de varios estudios muestra la capacidad de las MSC para perseguir un destino glial real funcional y morfológicamente (Wislet-Gendebien et al., 2005; Cai et al., 2011; Pan et al., 2012; Lattanzi et al., 2011). El origen embrionario común de ambas células, mesenquimales y neuronales, en la cresta neural de los vertebrados, podría explicar en parte el alto grado de plasticidad de las MSCs (Dupin et al., 2012).

8. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación pancreático

Nuestros datos muestran una eficiencia máxima de diferenciación en células productoras de insulina del 39%, alcanzado por la subpoblación c-kit+/CD105+ después de sólo una semana de inducción, eficiencia significativamente mayor que la del resto de la SVF. Kucia et al. (2006) utilizando un protocolo diferente al nuestro, y células VSEL (*Very Small Embryonic Like*) derivadas de médula ósea logra muy baja eficiencia tras la inducción de dos semanas y posterior marcaje inmunofluorescente de péptido C. Con ADSCs y protocolos mejorados, Timper et al. (2006) y Scholz et al.

(2009) -este último con el mismo protocolo utilizado en este estudio-, lograron mejores eficiencias a las 2 semanas en cultivo, identificando las células productoras de insulina morfológicamente y mediante inmuno-ensayo enzimático. Las variaciones con nuestros datos podrían ser debidas a varias diferencias técnicas, como la proteína elegida para revelar el fenotipo de páncreas, el método de detección o la duración del período de diferenciación. *In vivo*, la inyección de ADSCs de ratón transfectadas con el factor de transcripción de diferenciación pancreático PDX-1 en el páncreas de ratones con el páncreas lesionado por estreptozotocina promovió la diferenciación de las ADSCs en células secretoras de insulina y péptido C, además de restaurar parcialmente la función pancreática (Lin et al., 2009; Kajiyama et al., 2010). Por otra parte, cuando poblaciones clonales de ADSCs humanas o de ratón se prediferencian en células productoras de insulina *in vitro*, y se inyectan intraperitonealmente en ratones, encuentran que entre las 2-4 semanas el índice glucémico es restaurado en gran medida (Chandra et al., 2009, 2011). Nuestros datos sugieren que el uso de las subpoblaciones ADSC c-kit+, previamente diferenciadas en células productoras de insulina, podría mejorar aún más estos resultados.

9. Las ADSCs c-kit+ tienen mayor potencial de diferenciación hepático

Este estudio ha logrado una eficiencia máxima de diferenciación del 70% con la subpoblación c-kit+/CD105+, medida por la producción de albúmina después de sólo 10 días, una mejora notable en comparación con estudios anteriores que utilizan células CD105+ (presumiblemente c-kit negativas ya que la gran mayoría de las CD105+ lo son) (Banas et al., 2009). Banas et al. (2007) demostraron con ADSCs humanas inyectadas en ratones con daño hepático producido químicamente con CCl₄ que éstas se integraban en el parénquima hepático 24h después de la inyección. Estudios a más largo plazo con el mismo modelo experimental de daño hepático *in vivo* (Aurich et al., 2009) han mostrado un aumento notable (x10) de la permanencia del injerto cuando se utilizan ADSCs prediferenciadas *in vitro* frente a ADSCs indiferenciadas. En cuanto a regeneración hepática, en ratones con daño hepático provocado químicamente, se lograron reducir significativamente los niveles de amoníaco, aspartato

aminotransferasa, alanina aminotransferasa y ácido úrico 24 h después de la inyección de las ADSCs. Esto se logró con sólo el 20% de eficiencia de diferenciación *in vitro* (Banas et al., 2009). En otro estudio más reciente (Wang et al., 2012), el uso de ADSCs de rata indiferenciadas mejoró la microcirculación y rebajó la fibrosis en ratas con daño hepático después de 6 semanas, pero en el estudio no se proporcionan datos en relación con el injerto.

El uso de las subpoblaciones c-kit+, con una eficiencia media de diferenciación *in vitro* del 70%, podría mejorar los resultados en estudios similares, ya que, por un lado, se ha demostrado que las ADSCs, cuando se diferencian *in vitro*, desarrollan funciones hepatocíticas que incluirían formación de urea, síntesis de glucógeno, actividad enzimática citocromo P450 y expresión de transcritos específicos como la albúmina y el citocromo P450 (Aurich et al., 2009); y por otro lado, los estudios en modelos animales demuestran los efectos beneficiosos de las ADSCs prediferenciadas en regeneración hepática, al ser capaces de anidar en el hígado y mejorar algunas funciones propias, como el metabolismo de proteínas, regulación de la respuesta inmune innata y degradación de compuestos tóxicos (Dhawan et al., 2010).

10. Propuesta de un modelo de convivencia, diferenciación progresiva y regulación paracrina entre las subpoblaciones de ADSCs

Creemos que la mayor expresión y actividad telomerasa, así como la mayor eficiencia de diferenciación que demuestran las células ADSC c-kit+ hacia linajes endodérmicos, se deben a un estado previo de diferenciación de esta subpoblación respecto del resto de la SVF. En tejido pulmonar, Fang et al. (2012), describen una pequeña población de progenitores endoteliales ckit+ que suponen un 0,4% de las CD105+ (Lin-/CD31+) residentes en el endotelio de los vasos sanguíneos adultos con capacidad clonogénica *in vivo* e *in vitro* y capacidad de auto renovación a largo plazo, mientras que otros progenitores endoteliales tienen la capacidad proliferativa muy restringida. Estas VESCs (ckit+) son capaces, en experimentos de trasplante *in vivo* de una sola célula, de generar vasos sanguíneos funcionales que conectan con la circulación del hospedador. Bearzi et al. (2009), han encontrado células c-kit+ aisladas

o en pequeños grupos en las paredes vasculares de corazón humano, que muestran características de células madre tales como clonogenicidad y auto renovación, y además muestran potencial superior de diferenciación endotelial, muscular y cardíaco. Gambini et al. (2011) aíslan células ckit+ de corazón humano y las diferencian a fenotipos adiposo, óseo, endotelial y cardíaco. También las analizan por FACS y muchas coexpresan marcadores de MSC (CD90, CD105, etc). Proponen que las células ckit+ son auténticas células madre primitivas. Nuestros datos también muestran que la subpoblación c-kit+ aislada de la SVF tiene mayor potencial de diferenciación *in vitro* e, *in vivo*, se localiza en posición perivascular. De acuerdo con nuestra hipótesis, Gupta et al. (2012) y Tran et al. (2012), gracias al seguimiento *in vivo* de células, demuestran que en el tejido adiposo de adultos, en la transición de células progenitoras endoteliales a pericitos, las células endoteliales atraviesan la membrana basal y en el proceso dan lugar a los pericitos, los cuales adquieren características de MSCs y posteriormente de preadipocitos, mientras se mueven a través de las paredes capilares. Lin et al. (2010) estudian histológicamente el fenotipo del tejido adiposo humano, llegando a la conclusión de que las ASCs (*Adipose Stromal Cells*) son VSC (*Vascular Stem Cells*) en diferentes estadios de diferenciación. Todos estos datos sugieren que las células más cercanas en el desarrollo a los progenitores endoteliales están menos diferenciadas y, gracias a ello, tienen mayor plasticidad y potencial de diferenciación.

Por otro lado, Bendall et al. (2007) observan, en cultivos de células embrionarias (ESC) que éstas crean su propio nicho de células tipo fibroblasto, más diferenciadas, productoras de los factores de crecimiento –*Insulin Growth Factor* (IGF) y *Fibroblast Growth Factor* (FGF)- necesarios para mantener el fenotipo indiferenciado de las ESC. El hecho de que la subpoblación ADSC c-kit+ mantenga la misma proporción a través de los pases de cultivo también sugiere un estadio indiferenciado con divisiones mitóticas asimétricas.

Proponemos un modelo sencillo de interacción celular *in vitro* (Figura 17) en el que las células c-kit+ son auténticos progenitores *hemato-endoteliales* (HSC-VSC), que mantienen su proporción gracias a divisiones asimétricas que generan tipos celulares más diferenciados, con las que crean su propio soporte de células productoras de *stem cell factor* que retroalimenta la expresión de c-kit (que es el receptor del SCF en la

membrana plasmática) y por tanto el mantenimiento del fenotipo indiferenciado, quizás a través de la vía de señalización c-kit--AKT (De Miguel et al., 2002). Sería interesante comprobar como varían las proporciones de células c-kit+ y las eficiencias de diferenciación en cultivos suplementados con SCF; también hacer un seguimiento de células individuales c-kit+ marcadas y su progenie en cultivo, caracterizando apropiadamente a cada vástago. La relación de este modelo propuesto con los resultados al comparar las subpoblaciones obtenidas en base al marcador CD105, sugieren que las poblaciones c-kit+/CD105+ y c-kit+/CD105- se encuentran muy cercanas en lo que al estadio de diferenciación se refiere y más alejadas de las subpoblaciones c-kit- (CD105+/-); pero los resultados no permiten sacar conclusiones claras acerca del papel de CD105 en la progresión de la diferenciación (aunque me atrevería a sugerir que la adquisición del marcador CD105 por las células PLA en cultivo es consecuencia de la desdiferenciación asociada a la proliferación *in vitro*, no puedo relacionar este hecho con la expresión de c-kit).

Los sugerentes trabajos de Chazenbalk et al. (2011) acerca de la comunicación cruzada y plasticidad entre tipos celulares, y Han et al. (2010), que proponen que el tejido adiposo es una reserva extramedular de células madre (fenotipo y función) hematopoyéticas y progenitores celulares (HSPCs) que se caracterizan como Lin-/Sca-1+/c-kit+, nos hacen atrevernos a pensar en un modelo más ambicioso -de menor a mayor grado de diferenciación- de convivencia (*in vivo*) en el estroma vascular del tejido adiposo humano: HSC-VSC serían las auténticas células madre primitivas (c-kit+; con origen común, probablemente en la médula ósea embrionaria); que se diferenciarían en Pericitos, progenitores endoteliales y MSCs (adquiriendo el marcador CD146 en los dos primeros tipos celulares, el marcador CD105 en el segundo y el marcador CD90 en el último tipo; aunque como ya se ha comentado, con el cultivo *in vitro*, las MSCs adquirirán el marcador CD105), que se diferenciarían a su vez (y quizás indistintamente) en Preadipocitos/células vasculares-musculares/fibroblastos. En cualquier caso, hacen falta más estudios que caractericen los diferentes grados de diferenciación de las células que se encuentran en el tejido adiposo y la SVF humana.

En conclusión, nuestros datos sugieren que el aislamiento de subpoblaciones de ADSCs con anticuerpos anti-c-kit, independientemente de otros marcadores y del

pase de cultivo, permite la selección de una subpoblación más proliferativa y estable, con mayor actividad y expresión de telomerasa, con mayor potencial adipogénico, aumento de propiedades cardioprotectoras y mayor potencial de diferenciación endodérmico, pudiendo por lo tanto proporcionar una herramienta útil para futuras terapias específicas en diversas aplicaciones de medicina regenerativa.

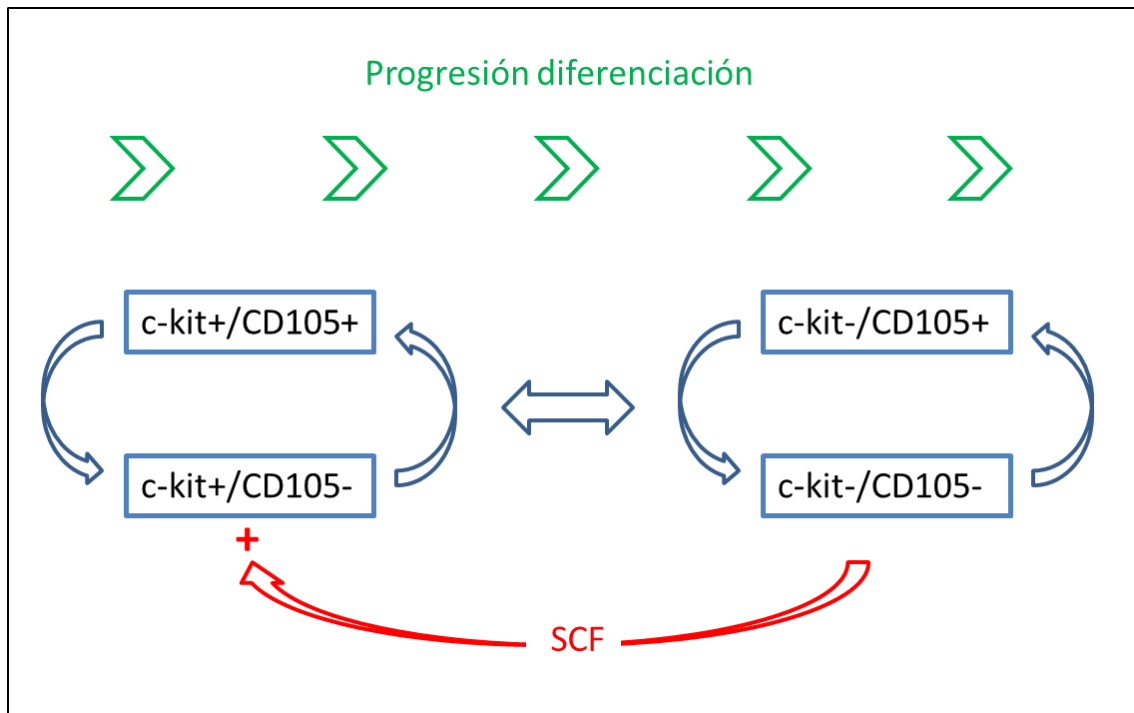


Figura 17: Modelo propuesto de convivencia, diferenciación y relación paracrina *in vitro* de las subpoblaciones estudiadas.

Conclusiones

1. Se puede aislar de la fracción vasculo-estromal adiposa humana, en base al anticuerpo anti c-kit, una subpoblación celular con características de célula madre multipotencial en un estadio de diferenciación previo al resto de las ADSCs. Esta subpoblación, *in vivo*, reside en el tejido adiposo y se ubica en localización perivascular. El cultivo previo con ánimo proliferativo no afecta a la proporción de células c-kit⁺ aisladas ni a su estabilidad genética.
2. La subpoblación c-kit⁺ de las ADSCs muestra altos índices de proliferación y autorrenovación, concordantes con una mayor expresión y actividad de la telomerasa.
3. La subpoblación c-kit⁺ de las ADSCs exhibe mayor capacidad en el mantenimiento de progenitores cardíacos y mayores potenciales de diferenciación adipogénico, pancreogénico y hepatogénico que el resto de las ADSCs.
4. La accesibilidad, velocidad de crecimiento, estabilidad en cultivo, plasticidad y eficiencia en la diferenciación hacen de la subpoblación ADSC c-kit⁺ una herramienta a tener en cuenta en futuras aplicaciones de Terapia celular y Medicina regenerativa.

Bibliografía

- Altanerova V, Cihova M, Babic M, Rychly B, Ondicova K, Mravec B, Altaner C. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosinedeaminase::uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *Int J Cancer*. 2012;130(10):2455-63.
- Altarche-Xifró W, Curato C, Kaschina E, Grzesiak A, Slavic S, Dong J, Kappert K, Steckelings M, Imboden H, Unger T, Li J. Cardiac c-kit+AT2+ cell population is increased in response to ischemic injury and supports cardiomyocyte performance. *Stem Cells*. 2009;27:2488-97
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425:968-73
- Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 2007;109(3):1298-306.
- Arnalich-Montiel, F., S. Pastor, A. Blazquez-Martinez, J. Fernandez-Delgado, M. Nistal, J.L. Alio, and M.P. De Miguel. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem cells*. 2008;26:570–9.
- Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(6):1922-31.
- Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, Brulport M, Hengstler JG, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. 2009;58:570-81.
- Bai WF, Xu WC, Feng Y, et al. Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons. *Cytotherapy*. 2013;15(8):961–970.
- Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;401:321–326.

- Bai X, Pinkernell K, Song YH, Nabzdyk C, Reiser J, Alt E. Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353:665-71.
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:70-7.
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46:219-28.
- Bearzi C, Leri A, Lo Monaco F, Rota M, Gonzalez A, Hosoda T, Pepe M, Qanud K, Ojaimi C, Bardelli S, D'Amario D, D'Alessandro DA, Michler RE, Dimmeler S, Zeiher AM, Urbanek K, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(37):15885-90.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-76.
- Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bossé M, Lajoie G, Bhatia M. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature.* 2007;448(7157):1015-21.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci.* 1992;102(Pt2):341-51.
- Bernardini C, Saulnier N, Parrilla C, et al. Early transcriptional events during osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells induced by Lim mineralization protein 3. *Gene Expression.* 2010;15(1):27–42.
- Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res.* 1999;251(2):257-63.

- Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001;414(6859):118-21.
- Blazquez-Martinez A, Chiesa M, Arnalich F, Fernandez-Delgado J, Nistal M, De Miguel MP. c-Kit identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in adipose tissue with higher telomerase expression and differentiation potential. *Differentiation*. 2014;87(3-4):147-60.
- Boden SD, Titus L, Hair G, et al. 1998 Volvo award winner in basic sciences studies: lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1) *Spine*. 1998;23(23):2486–2492.
- Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdaal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brinchmann JE. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell*. 2005;16:1131-41.
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-8.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):278-94.
- Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, March KL. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009;27:230–237.
- Cai S, Shea GKH, Tsui AYP, Chan YS, Shum DKY. Derivation of clinically applicable schwann cells from bone marrow stromal cells for neural repair and regeneration. *CNS and Neurological Disorders*. 2011;10(4):500–508.

- Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:370-9.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
- Chandra V, G S, Phadnis S, Nair PD, Bhonde RR. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*. 2009;27:1941-53.
- Chandra V, Swetha G, Muthyala S, Jaiswal AK, Bellare JR, Nair PD, Bhonde RR. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS One*. 2011;6:e20615.
- Chang JC, Lee PC, Lin YC, Lee KW, Hsu SH. Primary adipose-derived stem cells enriched by growth factor treatment improves cell adaptability toward cardiovascular differentiation in a rodent model of acute myocardial infarction. *J Stem Cells*. 2011;6:21-37.
- Chazenbalk G, Bertolotto C, Heneidi S, Jumabay M, Trivax B, Aronowitz J, Yoshimura K, Simmons CF, Dumesic DA, Azziz R. Novel pathway of adipogenesis through cross-talk between adipose tissue macrophages, adipose stem cells and adipocytes: evidence of cell plasticity. *PLoS One*. 2011;6(3):e17834.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(27):19027-30.
- Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10(20):3016-20.
- Colnot C. Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005;95(4):688–697.
- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
- Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galiè M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M,

- Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009;27:2624–2635.
- Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *Journal of Bone and Joint Surgery A*. 1995;77(5):734–750.
 - Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, et al. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Engineering*. 2005;11(3-4):645–658.
 - Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3:301-13.
 - Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem*. 2003;384(10-11):1391-409.
 - Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-13.
 - Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, Antonio EL, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One*. 2010;5:e12077.
 - Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:650-655.
 - De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1928-42.
 - De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, Ferraro G, D'Andrea F, Giuliano M, Libondi G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One*. 2009;4(8):e6537.

- De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10458-63.
- De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574-91.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101-9.
- Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;24:65-72.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, a Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.
- Donovan PJ, de Miguel M, Cheng L, Resnick JL. Primordial germ cells, stem cells and testicular cancer. *APMIS*. 1998;106(1):134-41.
- Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003;21(4):622–629.
- Dupin E, Sommer L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Developmental Biology*. 2012;366(1):83–95.
- Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *Journal of Bone and Joint Surgery A*. 2003;85(supplement 3):82–88.
- Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, Henning BJ, Stirparo GG, Papait R, Scarfò M, Agosti V, Viglietto G, Condorelli G, Indolfi C, Ottolenghi S, Torella D, Nadal-Ginard B. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are

- necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*. 2013;154(4):827-42.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109(1):235-42.
 - Fang S, Wei J, Pentimikko N, Leinonen H, Salven P. Generation of functional blood vessels from a single c-kit⁺ adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol*. 2012;10(10):e1001407.
 - Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 2004;25(4):581–611.
 - Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-30.
 - Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):658-66.
 - Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol*. 2006;168(2):659-69.
 - Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40.
 - Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Rudakow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.
 - Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47.

- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(1):55-64.
- Gambini E, Pompilio G, Biondi A, Alamanni F, Capogrossi MC, Agrifoglio M, Pesce M. C-kit⁺ cardiac progenitors exhibit mesenchymal markers and preferential cardiovascular commitment. *Cardiovasc Res*. 2011;89(2):362-73.
- Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007;109(4):1743-51.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169:12–20.
- Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314:420-7.
- Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Curcio CB, Floris M, Fiaschetti V, Floris R, Cervell V. A comparative translational study: the combined use of enhanced stromal vascular fraction and platelet-rich plasma improves fat grafting maintenance in breast reconstruction. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:341-51.
- Gerlach JC, Over P, Turner ME, Thompson RL, Foka HG, Chen WC, Péault B, Gridelli B, Schmelzer E. Perivascular mesenchymal progenitors in human fetal and adult liver. *Stem Cells Dev*. 2012;21:3258-69.
- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5:362-9.
- Goodell MA. Stem cells: is there a future in plastics? *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(6):662-5.

- Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988;106(6):2139-51.
- Groeneveld EHJ, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European Journal of Endocrinology.* 2000;142(1):9–21.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001;189:54-63.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30.
- Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, Frontini A, Bhowmick DC, Ye L, Cinti S, Spiegelman BM. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* 2012;15, 230–239.
- Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, and Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2010;115:957–64.
- Hauner H, Löffler G. Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part I: Adipose tissue development and the role of precursor cells. *Klin Wochenschr.* 1987;65(17):803-11.
- Hausman GJ, Campion DR. Histology of the stroma in developing rat subcutaneous adipose tissue. *J Anim Sci.* 1982;55(6):1336-42.
- Hausman GJ. Techniques for studying adipocytes. *Stain Technol.* 1981;56(3):149-54.
- Hong KM, Burdick MD, Phillips RJ, Heber D, Strieter RM. Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice. *FASEB J.* 2005;19:2029-31.

- Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):86-91.
- Hoogduijn MJ1, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev*. 2007;16(4):597-604.
- Hu F, Wang X, Liang G, et al. Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells. *Cellular Reprogramming*. 2013;15(3):224–232.
- Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(9):2363-70.
- In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102(4):1548-9.
- Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009;126(1-2):37-42.
- James AW, Pang S, Askarinam A, et al. Additive effects of sonic hedgehog and Nell-1 signaling in osteogenic versus adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells and Development*. 2012;21:2170–2178.

- Jankowski RJ, Deasy BM, Cao B, Gates C, Huard J. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *J Cell Sci.* 2002;115:4361-74.
- Jeon BG, Kumar BM, Kang EJ, Ock SA, Lee SL, Kwack DO, Byun JH, Park BW, Rho GJ. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. *Cell Tissue Res.* 2011;345(1):149-61.
- Jiang L, Zhu JK, Liu XL, Xiang P, Hu J, Yu WH. Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Neuroreport.* 2008;19:1015–1019.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 2002;30:896-904.
- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997;6(2):125-34.
- Kajiyama H, Hamazaki TS, Tokuhara M, Masui S, Okabayashi K, Ohnuma K, Yabe S, Yasuda K, Ishiura S, Okochi H, Asashima M. Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. *Int J Dev Biol.* 2010;54:699-705.
- Katz AJ, Llull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg.* 1999;26:587-603, viii.
- Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells.* 2005;23(3):412-23.
- Kim SW, Lee DW, Yu LH, Zhang HZ, Kim CE, Kim JM, Park TH, Cha KS, Seo SY, Roh MS, Lee KC, Jung JS, Kim MH. Mesenchymal stem cells overexpressing GCP-2 improve heart function through enhanced angiogenic properties in a myocardial infarction model. *Cardiovasc Res.* 2012;95:495-506.

- Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci*. 2009;53(2):96-102.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94:678-85.
- Ko MS, Jung JY, Shin IS, Choi EW, Kim JH, Kang SK, Ra JC. Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse. *Int J Med Sci*. 2011;8:231-8.
- Kronenwett R, Martin S, Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells*. 2000;18(5):320-30.
- Kucia, M., R. Reca, F.R. Campbell, E. Zuba-Surma, M. Majka, J. Ratajczak, and M.Z. Ratajczak. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*. 2006;20:857–69.
- Lanza RP, Langer RS, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2000.
- Lattanzi W, Geloso MC, Saulnier N, et al. Neurotrophic features of human adipose tissue-derived stromal cells: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:9 pages.468705.
- Lattanzi W, Parrilla C, Fetoni A, et al. Ex vivo-transduced autologous skin fibroblasts expressing human Lim mineralization protein-3 efficiently form new bone in animal models. *Gene Therapy*. 2008;15(19):1330–1343.
- Lattanzi W, Pola E, Pecorini G, Logroscino CA, Robbins PD. Gene therapy for in vivo bone formation: recent advances. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2005;9(3):167–174.
- Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:311-24.

- Lee SJ, Kang SW, Do HJ, et al. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2010;31(21):5652–5659.
- Lee SK, Kim DW, Dhong ES, Park SH, Yoon ES. Facial Soft Tissue Augmentation using Autologous Fat Mixed with Stromal Vascular Fraction. *Arch Plast Surg*. 2012;39:534-9.
- Li H, Fan X, Kovi RC, Jo Y, Moquin B, Konz R, Stoicov C, Kurt-Jones E, Grossman SR, Lyle S, Rogers AB, Montrose M, Houghton J. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res*. 2007;15;67(22):10889-98.
- Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, Matsushita N, Blusztajn A, Terrovitis J, Kusuoka H, Marbán L, Marbán E. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2012;59 (10), 942–953.
- Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010;25:807-15.
- Lin G, Wang G, Liu G, Yang LJ, Chang LJ, Lue TF, Lin CS. Treatment of type 1 diabetes with adipose tissue-derived stem cells expressing pancreatic duodenal homeobox 1. *Stem Cells Dev*. 2009;18(10):1399-406.
- Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev*. 2005;14:92-102.
- Loffler G, Hauner H. Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part II: The regulation of the adipogenic conversion by hormones and serum factors. *Klin Wochenschr*. 1987;65(17):812-7.
- Madonna R, Willerson JT, Geng YJ. Myocardin A enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation. *Stem cells*. 2008;26:202–11.

- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol.* 2000;185(1):98-106.
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med.* 2003;9:1195-201.
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997;276(5309):66-71.
- Meeran SM, Patel SN, Tollefsbol TO Sulforaphane Causes Epigenetic Repression of hTERT Expression in Human Breast Cancer Cell Lines. *PLoS One.* 2010;5(7):e11457.
- Menasche P. Stem cells for clinical use in cardiovascular medicine: current limitations and future perspectives, *Thromb Haemost.* 2005;94 (4):697-701.
- Metzle R, Alt C, Bai X, Yan Y, Zhang Z, Pan Z, Coleman M, Vykoukal J, Song YH, Alt E. Human adipose tissue-derived stem cells exhibit proliferation potential and spontaneous rhythmic contraction after fusion with neonatal rat cardiomyocytes. *FASEB J.* 2011;25 (3):830–9.
- Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;114:185-99.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5807-12.
- Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine.* 2008;33(8):863–869.
- Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, Torii S. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. *Differentiation.* 2005;73(2-3):69-78.

- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109:199-209.
- Muñoz-Chápuli R, Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Carmona R, González M. Differentiation of hemangioblasts from embryonic mesothelial cells? A model on the origin of the vertebrate cardiovascular system. *Differentiation*. 1999;64(3):133-41.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428:664-8.
- Neirinckx V, Marquet A, Coste C, Rogister B, Wislet-Gendebien S. Adult bone marrow neural crest stem cells and mesenchymal stem cells are not able to replace lost neurons in acute MPTP-lesioned mice. *PLoS ONE*. 2013;8(5)e64723.
- Nicoletti GF1, De Francesco F, D'Andrea F, Ferraro GA. Methods and procedures in adipose stem cells: state of the art and perspective for translation medicine. *J Cell Physiol*. 2015;230(3):489-95.
- Ning, H., G. Lin, T.F. Lue, and C.-S. Lin. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation*. 2006;74:510–8.
- Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Löwik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002;30:870-8.
- Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*. 2002;20:1060-9.
- Ogawa M, Larue AC, Watson PM, Watson DK. Hematopoietic stem cell origin of connective tissues. *Exp Hematol*. 2010;38(7):540-7.

- Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:871-7.
- Palpant NJ, Yasuda S, MacDougald O, Metzger JM. Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of Sca1+/c-kit+ adipose-derived murine stromal vascular cells into spontaneously beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:362-70.
- Pan Q, Fouraschen SM, de Ruiter PE, Dinjens WN, Kwekkeboom J, Tilanus HW, van der Laan LJ. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014;239(1):105-15.
- Pan Y, Cai S. Current state of the development of mesenchymal stem cells into clinically applicable Schwann cell transplants. *Molecular and Cellular Biology*. 2012;368:127–135.
- Park, E., and A.N. Patel. Changes in the expression pattern of mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells. *Cell biology international*. 2010;34:979–84.
- Parrilla C, Lattanzi W, Fetoni AR, Bussu F, Pola E, Paludetti G. Ex vivo gene therapy using autologous dermal fibroblasts expressing hLMP3 for rat mandibular bone regeneration. *Head and Neck*. 2010;32(3):310–318.
- Patrick CW. Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:109-30.
- Paul A, Shao W, Abbasi S, Shum-Tim D, Prakash S. PAMAM dendrimer-baculovirus nanocomplex for microencapsulated adipose stem cell-gene therapy: in vitro and in vivo functional assessment. *Mol Pharm*. 2012;9(9):2479-88.
- Paul SR, Yang YC, Donahue RE, Goldring S, Williams DA. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. *Blood*. 1991;77(8):1723-33.

- Peng H, Usas A, Olshanski A, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(11):2017–2027.
- Pérez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, Sassoon E, Delay E, Weiler-Mithoff EM. 2012. Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38:382-9.
- Pettersson P, Cigolini M, Sjöström L, Smith U, Björntorp P. Cells in human adipose tissue developing into adipocytes. *Acta Med Scand*. 1984;215(5):447-51.
- Pettersson P, Van R, Karlsson M, Björntorp P. Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. *Metabolism*. 1985;34(9):808-12.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-63.
- Pola E, Gao W, Zhou Y, et al. Efficient bone formation by gene transfer of human LIM mineralization protein-3. *Gene Therapy*. 2004;11(8):683–693.
- Prockop DJ. "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(3):241-3.

- Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res.* 2006;312:727-36.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-29.
- Quirici N., Scavullo C, de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, Deliliers GL, Brini AT. Anti-L-NGFR and -CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue. *Stem cells and development.* 2010;19:915–25.
- Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 2011;7:64–76.
- Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(3):775-9.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004;109:1292–1298.
- Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez JP, Harman RJ, Patel AN, Murphy MP, Lee RR, Minev B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2009;7:29.
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 2008;135(2):240-249.
- Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwietz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-

- term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009;69(13):5331-9.
- Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci.* 2009;10:273–284.
 - Ryu YJ, Cho TJ, Lee DS, Choi JY, Cho J. Phenotypic characterization and in vivo localization of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cells.* 2013;35(6):557-64.
 - Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, Holt SE. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res.* 2012;349(2):505-15.
 - Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294:371–379.
 - Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. Alteration of gene expression levels during osteogenic induction of human adipose derived stem cells in long-term culture. *Cell Tissue Bank.* 2013;14(2):289-301.
 - Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2521-9.
 - Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, De Angelis MG, Campbell KP, Bottinelli R, Cossu G. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science.* 2003;301:487-92.
 - Sanz-Ruiz R, Santos ME, Muñoa MD, Martín IL, Parma R, Fernández PL, Fernández-Avilés F. Adipose tissue-derived stem cells: the friendly side of a classic cardiovascular foe. *J Cardiovasc Transl Res.* 2008;1(1):55-63.

- Schäffler A., et al., Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies, *Stem Cells*. 2007;25(4):818-827.
- Scholz, T., S. Satyanarayan, S. Dhar, and G.R.D. Evans. Correlation of rapid phenotypic changes and insulin production of differentiated human adipose tissue-derived stem cells. *Annals of plastic surgery*. 2009;63:436–40.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002;109(10):1291-302.
- Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*. 2003;26(3):125-31.
- Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, Gimble JM. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem*. 2001;81(2):312-9.
- Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2005;205:114-22.
- Sengenès C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumié A. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells*. 2007;25:2269–76.
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:258-64.
- Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem*. 2009;42:194-200.
- Shyu KG, Wang BW, Hung HF, Chang CC, Shih DT. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial

- performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci.* 2006;13(1):47-58.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241(4861): 58-62.
 - Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1283-8.
 - Syftestad GT, Caplan AI. A fraction from extracts of demineralized adult bone stimulates the conversion of mesenchymal cells into chondrocytes. *Dev Biol.* 1984;104(2):348-56.
 - Taupin P. Adult neurogenesis, neural stem cells and Alzheimer's disease: developments, limitations, problems and promises. *Curr Alzheimer Res.* 2009;6:461–470.
 - Timper, K., D. Seboek, M. Eberhardt, P. Linscheid, M. Christ-Crain, U. Keller, B. Müller, and H. Zulewski. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006;341:1135–40.
 - Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med.* 2011;11:160–170.
 - Toma, J.G., I. a McKenzie, D. Bagli, and F.D. Miller. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem cells.* 2005;23:727–37.
 - Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circulation research.* 2008;102:77–85.
 - Tran KV, Gealekman O, Frontini A, Zingaretti MC, Morroni M, Giordano A, Smorlesi A, Perugini J, De Matteis R, Sbarbati A, Corvera S, Cinti S. The vascular

- endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab.* 2012;15, 222–229.
- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(1):32-45.
 - Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol.* 2003;23:37-49.
 - Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):194-201.
 - Van der Bogt KE, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. *Transplantation.* 2009;87:642–652.
 - Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells and Dev.* 2007;16:91–104.
 - Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995;18(12):1417-26.
 - Wan Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. The changes of stemness biomarkers expression in human adipose-derived stem cells during long-term manipulation. *Biotechnol Appl Biochem.* 2011;58:261-70.
 - Wang Y, Lian F, Li J, Fan W, Xu H, Yang X, Liang L, Chen W, Yang J. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *J Transl Med.* 2012;10:133.

- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.
- Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;(412):196-212.
- Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. 1999;65(1):22-6.
- Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Research Bulletin*. 2005;68(1-2):95–102.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61(4):364-70.
- Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Graber S, Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation*. 2007;75:12-23.
- Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Harii K. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J*. 2010;16:169-75.
- Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32:48-55.
- Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*. 2008;34:1178-85.
- Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208:64-76.

- Young HE, Black AC. Adult stem cells. The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. 2004;276:75–102.
- Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, Ericson K, Terracio L, Asahara T, Masuda H, Tamura-Ninomiya S, Detmer K, Bray RA, Steele TA, Hixson D, el-Kalay M, Tobin BW, Russ RD, Horst MN, Floyd JA, Henson NL, Hawkins KC, Groom J, Parikh A, Blake L, Bland LJ, Thompson AJ, Kirincich A, Moreau C, Hudson J, Bowyer FP 3rd, Lin TJ, Black AC Jr. 2004. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. Cell biochemistry and biophysics. 2004;40:1–80.
- Zamperone A, Pietronave S, Merlin S, Colangelo D, Ranaldo G, Medico E, Di Scipio F, Berta GN, Follenzi A, Prat M. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized multipotent mesenchymal cell line derived from mouse subcutaneous adipose tissue. Stem Cells Dev. 2013;22(21):2873-84.
- Zannettino AC, Paton S, Kortessidis A, Khor F, Itescu S, Gronthos S. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1bright/CD34⁺/CD45(-)/glycophorin-A-bone marrow cells. Haematologica. 2007;92:1707-8.
- Zarnett R, Salter RB. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. Can J Surg. 1989;32(3):171-4.
- Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G, Cortivo R. Neural potential of adipose stem cells. Discov Med. 2010;10:37–43.
- Zhang Y, Madhu V, Dighe AS, Irvine JN, Jr., Cui Q. Osteogenic response of human adipose-derived stem cells to BMP-6, VEGF, and combined VEGF plus BMP-6 in vitro. Growth Factors. 2012;30:333–343.
- Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. Cytometry A. 2010;77(1):22-30.
- Zolochovska O, Yu G, Gimble JM, Figueiredo ML. Pigment epithelial-derived factor and melanoma differentiation associated gene-7 cytokine gene therapies

- delivered by adipose-derived stromal/mesenchymal stem cells are effective in reducing prostate cancer cell growth. *Stem Cells Dev.* 2012;21(7):1112-23.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.
 - Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 1. 2001;7:211-28.
 - Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-88.

Anexos

